

TRẦN VIẾT CƯỜNG (Chủ biên)
BÙI VĂN HẠT, LÊ THỊ BÍCH LAM, NGUYỄN XUÂN HUY
PHẠM QUANG HÀ, BIỀN VĂN MINH

GIÁO TRÌNH

VI SINH VẬT HỌC

MÔI TRƯỜNG

NHÀ XUẤT BẢN BÁCH KHOA HÀ NỘI

Biên mục trên xuất bản phẩm của Thư viện Quốc gia Việt Nam

Giáo trình vi sinh vật học môi trường / Trần Viết Cường (ch.b.), Bùi Văn Hạt, Lê Thị Bích Lam... - H. : Bách khoa Hà Nội, 2018. - 368tr. : hình vẽ, bảng ; 27cm

Thư mục: tr. 366-367

1. Vิ sinh vật học 2. Môi trường 3. Giáo trình
579.0711 - dc23

BKM0072p-CIP

LỜI NÓI ĐẦU

Vi sinh vật học môi trường là ngành khoa học nghiên cứu các đối tượng vi sinh vật tồn tại trong môi trường tự nhiên và nhân tạo. Nguồn gốc của các nghiên cứu bắt đầu từ sự quan sát của Antonie van Leeuwenhoek (1684). Ông đã sử dụng những chiếc kính hiển vi thủ công tự tay làm và là người đầu tiên quan sát thấy các vi khuẩn và động vật nguyên sinh mà ông gọi là “animalcules” (những động vật nhỏ bé), ngày nay được gọi là “vi sinh vật”. Trong suốt nhiều thế kỷ tiếp theo, sự hiểu biết của chúng ta về vi sinh vật môi trường được dựa trên những quan sát chi tiết và các thí nghiệm với sự giúp đỡ của kính hiển vi và các công cụ lý, hóa, sinh cũng như toán học hiện đại.

Như chúng ta đã biết, vi sinh vật hiện diện khắp nơi, trong đất, trong nước, không khí, trong cơ thể sinh vật khác, đặc biệt chúng có thể tồn tại trong những môi trường khắc nghiệt nhất. Chúng đóng vai trò quan trọng trong vòng tuần hoàn vật chất. Vì thế, chúng được xem là một mắt xích quan trọng trong quá trình chuyển hóa vật chất.

Giáo trình vi sinh vật học môi trường dùng cho sinh viên ngành Khoa học môi trường gồm hai tín chỉ lý thuyết và một tín chỉ thực hành, giới thiệu một cách khái quát về các nhóm vi sinh vật, các quá trình chuyển hóa vật chất trong môi trường tự nhiên và nhân tạo. Qua đó, người học có thể nắm bắt được các quy luật chuyển hóa chất hữu cơ và vô cơ bởi vi sinh vật nhằm điều khiển và áp dụng chúng một cách hiệu quả trong các công trình xử lý chất thải. Nghiên cứu sự tác động tương hỗ giữa các cơ thể vi sinh vật, giữa vi sinh vật và môi trường (các tác nhân lý, hóa và sinh học) nhằm kiểm soát sự sinh trưởng, phát triển và nâng cao hiệu quả xử lý chất thải của chúng khi được áp dụng. Từ đó chúng ta sẽ có những hiểu biết đúng đắn về vi sinh vật và tầm quan trọng của chúng trong môi trường tự nhiên cũng như nhân tạo.

Để giúp cho sinh viên tự học, tự nghiên cứu, trong quá trình biên soạn, chúng tôi đã cố gắng đưa vào giáo trình những kiến thức cơ bản nhất, hiện đại nhất của vi sinh vật học môi trường, đồng thời chú ý những vấn đề gợi mở cần tiếp tục nghiên cứu. Mỗi chương đều có trình bày mục tiêu, tóm tắt chương, bài tập, câu hỏi gợi mở, giải thích thuật ngữ khó.

Mặc dù đã có nhiều cố gắng để hoàn thiện nội dung nhưng giáo trình chắc chắn không thể tránh khỏi những nhược điểm và thiếu sót nhất định. Vì vậy, chúng tôi rất mong nhận được những ý kiến đóng góp của bạn đọc để cuốn sách được hoàn thiện hơn cho lần xuất bản sau.

Chúng tôi xin chân thành tiếp thu và cảm ơn!

CÁC TÁC GIẢ

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

ATP	Adenosine triphosphate
BOD	Biochemical Oxygen demand (Nhu cầu oxy sinh hóa)
CMC	Carboxymethyl cellulose
COD	Chemical Oxygen Demand (Nhu cầu oxy hóa học)
CFU	Colony-forming unit (Đơn vị hình thành khuẩn lạc)
CKS	Chất kháng sinh
DO	Dissolved Oxygen (Lượng oxy hòa tan trong nước cần thiết cho sự hô hấp của các sinh vật nước)
DNA	Deoxyribonucleic acid
ĐVNS	Động vật nguyên sinh
F-6-P	Fructose-6-phosphate
FAD	Flavin adenine dinucleotide
G-6-P	Glucose-6-phosphate
GAP	Glyceraldehyde phosphate
KDPG	2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconate
N	Nitrogen (Nitơ)
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide dạng oxy hóa
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide dạng khử
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dạng oxy hóa
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dạng khử
MT	Môi trường
PP	Pentose phosphate
RNA	Ribonucleic acid
TDS	Total dissolved solids (Tổng chất rắn hòa tan)
TSS	Turbidity & suspendid solids (Tổng chất rắn lơ lửng)
TOC	Total Organic Carbon (Tổng carbon hữu cơ)
TS	Total solids (Tổng chất rắn)
VOCs	Volatile Organic Compounds (Các hợp chất hữu cơ bay hơi)
SS	Suspended solids (Chất rắn lơ lửng)
VK	Vi khuẩn
VSV	Vi sinh vật

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU.....	3
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	4
CHƯƠNG MỞ ĐẦU	15
0.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ NHIỆM VỤ CỦA VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG	15
0.1.1. Khái niệm chung	15
0.1.2. Nội dung môn học vi sinh vật học môi trường.....	17
0.1.3. Yêu cầu môn học vi sinh vật học môi trường	17
0.2. LỊCH SỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG	18
0.2.1. Lịch sử nghiên cứu	18
0.2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	20
0.3. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG	21
0.3.1. Vai trò của vi sinh vật trong tự nhiên.....	21
0.3.2. Vai trò của vi sinh vật trong đời sống và sản xuất của con người	21
0.4. ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG VIỆT NAM	22
0.4.1. Nghiên cứu cơ bản	22
0.4.2. Nghiên cứu ứng dụng và triển khai kỹ thuật.....	22
0.4.3. Xúc tiến hoạt động chuyển giao công nghệ tiên tiến	23
0.5. VỊ TRÍ VI SINH VẬT TRONG SINH GIỚI.....	23
0.5.1. Một số hệ thống sinh giới.....	23
0.5.2. Vi sinh vật là một hợp phần của môi trường sống	26
TÓM TẮT CHƯƠNG	26
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	27
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ.....	28
Chương 1. VI SINH VẬT NHÂN SO	30
1.1. VI KHUẨN (Bacteria)	30
1.1.1. Hình dạng và kích thước	30
1.1.2. Cấu trúc của vi khuẩn.....	32

1.2. VI KHUẨN ĐẶC BIỆT	39
1.2.1. Xạ khuẩn (Actinomycetes).....	39
1.2.2. Niêm vi khuẩn (Myxobacteriales).....	41
1.2.3. Xoắn thê (Spirochaetales)	41
1.2.4. Mycoplasma	41
1.2.5. Rickettsia.....	42
1.2.6. Chlamydia	43
1.2.7. Vi khuẩn lam (Cyanobacteria)	44
1.2.8. Ý nghĩa thực tiễn của vi khuẩn.....	44
1.3. VI KHUẨN CỎ (<i>Archaea</i>)	45
1.3.1. Các cơ thể sinh methane (methanogenes)	45
1.3.2. Các cơ thể ưa mặn (halophiles).....	45
1.3.3. Vi khuẩn cỏ ưa nhiệt cao (hyperthermophiles)	46
1.3.4. Các cơ thể ưa nhiệt cao, ưa acid (Thermoacidophiles)	46
1.3.5. Vai trò của vi khuẩn cỏ	46
TÓM TẮT CHƯƠNG	48
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	50
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ	51
 Chương 2. VI SINH VẬT NHÂN THỰC.....	52
2.1. VI NẤM (Microfungi) VÀ NẤM MŨ (Crimini).....	52
2.1.1. Nấm men (Yeast, Levures)	54
2.1.2. Nấm sợi (Molds)	57
2.1.3. Nấm mũ (Crimini).....	60
2.2. VI TẢO (Microalgae)	63
2.2.1. Đặc điểm chung.....	63
2.2.2. Đời sống của vi tảo.....	63
2.2.3. Vai trò của vi tảo trong môi trường.....	64
2.3. ĐỘNG VẬT NGUYÊN SINH.....	65
2.3.1. Đặc điểm chung.....	65
2.3.2. Các nhóm động vật nguyên sinh	66
2.3.3. Vai trò của động vật nguyên sinh trong môi trường	66
TÓM TẮT CHƯƠNG	67
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	68
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ	69

Chương 3. VIRUS HỌC.....	70
3.1. LỊCH SỬ PHÁT HIỆN VIRUS	70
3.2. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA VIRUS	72
3.3. HÌNH DẠNG, KÍCH THƯỚC VÀ CẤU TRÚC CỦA VIRUS	73
3.3.1. Hình dạng và kích thước	73
3.3.2. Cấu trúc của virus.....	74
3.4. SỰ NHÂN LÊN CỦA VIRUS.....	78
3.4.1. Hấp phụ	78
3.4.2. Xâm nhập, cởi vỏ và phiên mã.....	79
3.4.3. Tổng hợp các thành phần của virus.....	80
3.4.4. Lắp ráp.....	81
3.4.5. Giải phóng	81
3.5. BACTERIOPHAGE	81
3.5.1. Cấu trúc của phage	81
3.5.2. Sự nhân lên của phage độc trong vi khuẩn.....	82
3.5.3. Tính tiềm tan và phage lambda (λ)	83
3.5.4. Phương pháp khảo sát phage.....	84
3.5.5. Ứng dụng của phage.....	85
3.6. CÁC BỆNH DO VIRUS.....	86
3.7. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC TÁC NHÂN VẬT LÝ, HÓA HỌC ĐẾN VIRUS ..	88
3.8. CÁC THỰC THỂ DƯỚI VIRUS	88
3.8.1. Viroid	88
3.8.2. Prion	89
TÓM TẮT CHƯƠNG	93
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	93
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ	95

Chương 4. SINH LÝ HỌC VI SINH VẬT	96
4.1. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA VI SINH VẬT	96
4.1.1. Nước	96
4.1.2. Protein	96
4.1.3. Carbohydrate	97
4.1.4. Lipid và các chất tương tự (lipoid).....	97
4.1.5. Một số chất hữu cơ có hoạt tính sinh học.....	97
4.1.6. Các nguyên tố khoáng	97

4.2. DINH DUỒNG CỦA VI SINH VẬT	97
4.2.1. Nhu cầu dinh dưỡng	97
4.2.2. Chất dinh dưỡng và môi trường nuôi cây vi sinh vật.....	98
4.2.3. Các kiểu dinh dưỡng ở vi sinh vật.....	99
4.2.4. Vi sinh vật nguyên dưỡng và khuyết dưỡng	101
4.3. SINH TRƯỞNG VÀ SINH SẢN CỦA VI SINH VẬT	101
4.3.1. Các nhân tố sinh trưởng	101
4.3.2. Điều kiện sinh trưởng.....	101
4.3.3. Sinh lý học sinh trưởng của vi sinh vật	104
4.3.4. Sinh trưởng trong môi trường tự nhiên	109
4.3.5. Sinh sản ở vi sinh vật	111
4.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG.....	113
4.4.1. Phương pháp dùng hóa chất	113
4.4.2. Khử trùng bằng các phương pháp vật lý	115
4.4.3. Khử trùng bằng phương pháp phối hợp	116
4.4.4. Một số phương pháp khác	117
4.5. CÁC PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN CHỦNG GIÓNG VI SINH VẬT.....	117
4.5.1. Cây truyền thường xuyên trên thạch nghiêng hoặc trích sâu vào thạch	117
4.5.2. Các phương pháp bảo quản vi sinh vật khác.....	117
4.6. HÔ HẤP, CHUYÊN HÓA VÀ LÊN MEN CỦA VI SINH VẬT	118
4.6.1. Hô hấp ở vi sinh vật	118
4.6.2. Chuyển hóa của vi sinh vật	120
4.6.3. Một số quá trình lên men của vi sinh vật	120
TÓM TẮT CHƯƠNG	127
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	127
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ	129

Chương 5. VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG ĐẤT.....130

5.1. MÔI TRƯỜNG ĐẤT	130
5.1.1. Thành phần rắn.....	130
5.1.2. Thành phần lỏng.....	133
5.1.3. Thành phần không khí.....	133
5.1.4. Thực trạng thoái hóa đất tự nhiên ở Việt Nam.....	134
5.2. ĐẤT LÀ MÔI TRƯỜNG SỐNG CỦA VI SINH VẬT	136
5.2.1. Các yếu tố sinh học	136
5.2.2. Mối quan hệ giữa các nhóm vi sinh vật trong đất	136

5.2.3. Các yếu tố lý hóa học	137
5.3. VI SINH VẬT TRONG ĐẤT	138
5.3.1. Vi khuẩn (Bacteria)	139
5.3.2. Xạ khuẩn (Actinomycetes).....	141
5.3.3. Vi khuẩn cổ	141
5.3.4. Vi nấm (Microfungi)	141
5.3.5. Tảo (Algae)	142
5.3.6. Động vật nguyên sinh (Protozoa).....	143
5.4. SỰ CHUYỂN HÓA CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ, VÔ CƠ TRONG ĐẤT	144
5.4.1. Sự chuyển hóa các hợp chất carbon của vi sinh vật.....	144
5.4.2. Sự chuyển hóa các hợp chất hữu cơ chứa nitơ do vi sinh vật	148
5.4.3. Sự chuyển hóa các hợp chất chứa phosphor của vi sinh vật	159
5.4.4. Khả năng chuyển hóa các hợp chất chứa lưu huỳnh của vi sinh vật	162
5.5. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG ĐẤT	164
TÓM TẮT CHƯƠNG.....	164
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	165
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ.....	166

Chương 6. VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG KHÔNG KHÍ	167
6.1. MÔI TRƯỜNG KHÔNG KHÍ.....	167
6.2. SOL KHÍ VÀ SOL KHÍ SINH HỌC.....	169
6.2.1. Sol khí	169
6.2.2. Sol khí sinh học	169
6.3. CHU TRÌNH VI SINH VẬT KHÔNG KHÍ.....	169
6.3.1. Quá trình thải.....	169
6.3.2. Phát tán.....	170
6.3.3. Lắng đọng.....	170
6.4. VI SINH VẬT TỒN TẠI TRONG KHÔNG KHÍ	171
6.4.1. Độ ẩm tương đối.....	171
6.4.2. Nhiệt độ	172
6.4.3. Tia bức xạ.....	172
6.4.4. Oxy, các yếu tố kết hợp không khí (AOF) và ion	172
6.5. VI SINH VẬT KHÔNG KHÍ NGOÀI TRỜI	173
6.5.1. Phát tán lên không khí của mầm bệnh vi sinh vật trong đất.....	173
6.5.2. Đại dịch cúm	173
6.5.3. Vi sinh vật trong mây	173

6.5.4. Nông nghiệp	173
6.5.5. Nước thải	174
6.5.6. Các độc tố trong không khí	174
6.6. VI SINH VẬT KHÔNG KHÍ TRONG NHÀ	175
6.7. KIỂM SOÁT SOL KHÍ SINH HỌC	176
6.7.1. Thông gió	176
6.7.2. Lọc khí	176
6.7.3. Khử trùng không khí bằng các phương pháp vật lý hoặc hóa chất	177
6.7.4. Cách ly	178
TÓM TẮT CHƯƠNG	178
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	179
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ	179

Chương 7. VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG NƯỚC	180
7.1. SINH CẢNH VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC	180
7.1.1. Các đặc điểm lý hóa	181
7.1.2. Vi sinh vật phù du	183
7.1.3. Vi sinh vật tầng đáy	184
7.2. CÁC KIỀU DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC	184
7.2.1. Sinh vật sản xuất	184
7.2.2. Sinh vật tiêu thụ	185
7.2.3. Quang dị dưỡng (Photoheterotrophy)	186
7.3. MÔI TRƯỜNG BIỂN	186
7.3.1. Quần xã sinh vật phù du ở đại dương	186
7.3.2. Quần xã sinh vật phù du ở tầng đáy biển	190
7.4. MÔI TRƯỜNG NƯỚC NGỌT	190
7.5. KIỂM SOÁT VÀ NGĂN NGỪA Ô NHIỄM NƯỚC Ở VIỆT NAM	191
7.5.1. Thực trạng	191
7.5.2. Nguyên nhân	192
7.5.3. Tác hại của ô nhiễm nguồn nước	193
7.5.4. Biện pháp khắc phục	193
TÓM TẮT CHƯƠNG	194
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	195

Chương 8. VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG CỰC TRỊ	197
8.1. MÔI TRƯỜNG CỰC TRỊ	197
8.2. MÔI TRƯỜNG NHIỆT ĐỘ THẤP	197
8.3. MÔI TRƯỜNG NHIỆT ĐỘ CAO	198
8.4. MÔI TRƯỜNG KHÔ VÀ BỨC XẠ CỰC TÍM	201
8.5. MÔI TRƯỜNG THIẾU ÁNH SÁNG	203
8.5.1. Các miệng phun thủy nhiệt ở đáy biển sâu	203
8.5.2. Hang động đá vôi ở sa mạc	204
TÓM TẮT CHƯƠNG	205
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	206
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ	207
Chương 9. VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ PHẾ THẢI	208
9.1. NGUỒN GỐC PHẾ THẢI VÀ BIỆN PHÁP XỬ LÝ	208
9.1.1. Nguồn gốc phế thải	208
9.1.2. Biện pháp xử lý phế thải	209
9.2. SỬ DỤNG VI SINH VẬT XỬ LÝ RÁC THẢI SINH HOẠT	210
9.2.1. Thành phần của rác thải sinh hoạt	210
9.2.2. Vi sinh vật phân giải rác thải sinh hoạt	211
9.3. SỬ DỤNG VI SINH VẬT XỬ LÝ NUỚC THẢI	212
9.3.1. Nguồn nước thải	212
9.3.2. Khu hệ vi sinh vật và các tác nhân gây bệnh trong nước thải	213
9.3.3. Vai trò tự làm sạch nước thải của vi sinh vật	214
9.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ PHẾ THẢI	215
9.4.1. Xử lý nước thải	215
9.4.2. Xử lý chất thải rắn bằng phương pháp sinh học	228
9.5. PHÁT TRIỂN CÁC QUÁ TRÌNH XỬ LÝ CHẤT THẢI THÂN THIỆN VỚI MÔI TRƯỜNG	233
9.5.1. Phát triển và thiết kế các nồi phản ứng sinh học (Bioreactor)	233
9.5.2. Quản lý chất thải tích hợp (integrates waste management)	234
9.5.3. Ứng dụng công nghệ vi sinh vật xử lý chất thải	234
TÓM TẮT CHƯƠNG	234
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	236
GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ	236

Chương 10. CHÉ PHẨM VI SINH VẬT VÀ CÁCH SỬ DỤNG.....	237
10.1. CÁC DẠNG CHÉ PHẨM VI SINH VẬT.....	237
10.1.1. Ché phẩm vi khuẩn.....	237
10.1.2. Ché phẩm vi nấm	240
10.1.3. Ché phẩm virus.....	241
10.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG CHÉ PHẨM VI SINH VẬT	241
10.2.1. Phương pháp nhiễm vào hạt giống.....	241
10.2.2. Phương pháp hồ rễ cây	242
10.2.3. Bón ché phẩm vi sinh vật vào đất	242
10.2.4. Phun, tưới ché phẩm vi sinh vật lên cây hoặc vào đất	242
10.3. MỘT SỐ CHÉ PHẨM VI SINH VẬT THÔNG DỤNG.....	243
10.3.1. Ché phẩm EM.....	243
10.3.2. Ché phẩm cố định nitơ	244
10.3.3. Phân lân vi sinh	245
10.3.4. Ché phẩm sinh học BIMA (Trichoderma)	246
10.3.5. Ché phẩm sinh học xử lý nước thải BIO-EM	248
10.3.6. Ché phẩm sinh học “Vườn Sinh Thái” đối với nuôi trồng thủy sản.....	248
TÓM TẮT CHƯƠNG	249
CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP	249

THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG	250
Phần 1. NHỮNG CHỈ DẪN CHUNG.....	250
1. QUY ĐỊNH KHI THỰC HÀNH	250
2. MỘT SỐ THIẾT BỊ, DỤNG CỤ THÍ NGHIỆM CẦN THIẾT	251
2.1. Thiết bị	251
2.2. Dụng cụ	254
3. XỬ LÝ VÀ BAO GÓI DỤNG CỤ, VẬT LIỆU THÍ NGHIỆM	255
3.1. Xử lý các dụng cụ thủy tinh	255
3.2. Bao gói dụng cụ vật liệu.....	256
3.3. Vật liệu	256
3.4. Các dụng cụ cần thiết	257
3.5. Pha chế	257
4. SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN KÍNH HIỂN VI	257
4.1. Sử dụng kính hiển vi	257
4.2. Bảo quản kính hiển vi	259

Phần 2. HƯỚNG DẪN THỰC HÀNH	261
Bài 1. Làm tiêu bản và nhuộm tế bào vi sinh vật.....	261
Bài 2. Pha chế môi trường dinh dưỡng	276
Bài 3. Phân lập, nuôi cấy và giữ giống vi sinh vật.....	282
Bài 4. Đo kích thước tế bào và đếm số lượng vi sinh vật	290
Bài 5. Các tính chất sinh hóa của vi sinh vật	302
Bài 6. Lên men và phân giải các phé thải hữu cơ	313
Bài 7. Vi khuẩn cố định nitơ – sản xuất và sử dụng nitragin.....	327
Bài 8. Xác định hoạt tính enzyme và chất kháng sinh của vi sinh vật	335
Bài 9. Phân tích vi sinh vật trong chất thải hữu cơ	342
Bài 10. Tham quan thực tế cơ sở xử lý chất thải.....	352
CÂU HỎI ÔN TẬP VÀ GỢI Ý TRẢ LỜI CÁC BÀI TẬP	354
PHỤ LỤC	360
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	366

CHƯƠNG MỞ ĐẦU

Mục tiêu

- Nắm được một cách tổng quát về khái niệm, đặc điểm, nội dung, lịch sử nghiên cứu và vai trò của vi sinh vật học môi trường.
- Hiểu được sự phân bố và vai trò của vi sinh vật trong các môi trường đất, nước, không khí...
- Biết được những định hướng nghiên cứu VSV môi trường hiện nay ở Việt Nam.
- Vận dụng được kiến thức về vi sinh vật học môi trường vào thực tiễn cuộc sống, góp phần bảo vệ và phát triển môi trường bền vững.

0.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ NHIỆM VỤ CỦA VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG

0.1.1. Khái niệm chung

Vi sinh vật (*Microorganisms*) là tên gọi chung của những sinh vật có kích thước nhỏ bé mà mắt thường không nhìn thấy được, chỉ có thể quan sát chúng bằng kính hiển vi. Vi sinh vật (VSV) gồm rất nhiều nhóm khác nhau: virus và các thực thể dưới virus, vi khuẩn, cỏ khuẩn, vi nấm, protozoa, vi tảo...

Môi trường là hệ thống các yếu tố vật chất tự nhiên và nhân tạo có tác động đến sự tồn tại và phát triển của con người và sinh vật (*Điều 3, Luật Bảo vệ Môi trường, 2014*).

Theo Luật Bảo vệ Môi trường của Việt Nam, 2014: "Ô nhiễm môi trường là sự biến đổi của các thành phần môi trường không phù hợp với quy chuẩn kỹ thuật môi trường và tiêu chuẩn môi trường gây ảnh hưởng xấu đến con người và sinh vật". Trên thế giới, ô nhiễm môi trường được hiểu là việc chuyển các chất thải hoặc năng lượng vào môi trường đến mức có khả năng gây hại đến sức khỏe con người, đến sự phát triển sinh vật hoặc làm suy giảm chất lượng môi trường. Các tác nhân gây ô nhiễm bao gồm các chất thải ở dạng khí (khí thải), lỏng (nước thải), rắn (chất thải rắn) chứa hóa chất hoặc tác nhân vật lý, sinh học và các dạng năng lượng như nhiệt độ, bức xạ. Tuy nhiên, môi trường chỉ được coi là bị ô nhiễm nếu trong đó hàm lượng, nồng độ hoặc cường độ các tác nhân trên đạt đến mức có khả năng tác động xấu đến con người, sinh vật và vật liệu.

Bảo vệ môi trường là những hoạt động giữ cho môi trường trong lành, sạch đẹp, cải thiện môi trường, đảm bảo cân bằng sinh thái, ngăn chặn, khắc phục các hậu quả xấu do con người và thiên nhiên gây ra cho môi trường, khai thác, sử dụng hợp lý và tiết kiệm tài nguyên thiên nhiên. "Hoạt động bảo vệ môi trường là hoạt động giữ gìn, phòng ngừa,

hạn chế các tác động xấu đến môi trường; ứng phó sự cố môi trường; khắc phục ô nhiễm, suy thoái; cải thiện, phục hồi môi trường; khai thác, sử dụng hợp lý tài nguyên thiên nhiên nhằm giữ môi trường trong lành". (*Điều 3, Luật Bảo vệ Môi trường, 2014*).

Vi sinh vật học môi trường (*Environmental microbiology*) là một môn khoa học nghiên cứu về những hoạt động sinh lý của VSV có ảnh hưởng đến chất lượng của môi trường, tìm hiểu các quy luật phát triển của VSV trong môi trường để có những biện pháp ngăn ngừa tác động tiêu cực và phát huy tác động tích cực của chúng trong quá trình bảo vệ và phát triển môi trường bền vững. Vi sinh vật học môi trường nghiên cứu về vi sinh vật trong tất cả các loại môi trường sống (đất, nước, không khí và môi trường cực trị...) và sự tác động có lợi cũng như có hại của chúng đến sức khỏe và phúc lợi của con người. Vi sinh vật học môi trường có mối liên hệ mật thiết với các môn khoa học khác (hình 0.1).



Hình 0.1. Mối quan hệ giữa vi sinh vật học môi trường với các ngành khoa học khác.
(Pepper et al., 2015).

Phục hồi sinh học (*Bioremediation*) – đây là quá trình làm sạch nhờ sử dụng các hệ thống sinh học (chủ yếu là các VSV) đưa môi trường trở lại trạng thái ban đầu hoặc chí ít là làm cho nó ít độc hại hơn hoặc giảm nồng độ độc hại đến mức an toàn. Đối với vi sinh vật môi trường, xử lý sinh học liên quan đến việc tăng cường và tối ưu hóa quá trình phân hủy bằng vi sinh vật các chất gây ô nhiễm để mang lại môi trường trong sạch và giảm tác động tiêu cực đến sức khỏe con người.

0.1.2. Nội dung môn học vi sinh vật học môi trường

– Tìm hiểu các quy luật về sự phát sinh, phát triển và tiến hóa của VSV, về hình thái, cấu tạo, sinh lý, sinh hóa, di truyền của các nhóm VSV thường gặp trong môi trường tự nhiên.

– Nghiên cứu vai trò to lớn về nhiều mặt của các nhóm VSV trong tự nhiên, trên cơ sở tìm kiếm các giải pháp, biện pháp, các phương pháp nhằm khai thác một cách đầy đủ nhất những tác động tích cực của VSV và ngăn chặn một cách hiệu quả nhất các tác động có hại của chúng.

– Nắm được nguyên lý cơ bản của công nghệ vi sinh, bản chất của từng chế phẩm vi sinh vật, quy trình công nghệ, hiệu quả tác dụng và cách sử dụng từng loại chế phẩm vi sinh vật dùng trong xử lý chất thải, phế thải chống ô nhiễm môi trường.

– Định hướng trong nghiên cứu về các lĩnh vực của công nghệ vi sinh để tạo ra nhiều loại chế phẩm vi sinh vật hữu ích ứng dụng vào công tác bảo vệ, cải tạo và phát triển môi trường bền vững.

0.1.3. Yêu cầu môn học vi sinh vật học môi trường

Sau khi học xong môn học này, người học phải hình thành được các năng lực cơ bản sau:

0.1.3.1. Về kiến thức

Sau khi nghiên cứu học phần này, sinh viên có thể hiểu được thực trạng, những nguyên nhân chính gây ô nhiễm môi trường, cơ sở khoa học và các biện pháp vi sinh vật góp phần bảo vệ và phát triển môi trường bền vững hiện nay.

0.1.3.2. Về kỹ năng

– Trang bị cho sinh viên cơ sở lý luận và thực tiễn về phương pháp nghiên cứu, phân lập, nuôi cấy, định loại các vi sinh vật sống trong môi trường đất, nước, không khí, vật phẩm và môi trường cực trị.

– Rèn luyện kỹ năng tư duy tổng hợp, biết lựa chọn, vận dụng những nội dung thích hợp vào bảo vệ và phát triển môi trường bền vững cũng như thực tiễn sản xuất, đời sống.

0.1.3.3. Về thái độ

– Yêu thích môn vi sinh vật học môi trường với mong muốn khám phá những đặc tính còn tiềm ẩn của thế giới vi sinh vật kỳ diệu ảnh hưởng đến môi trường sống.

– Có năng lực tự học, tự nghiên cứu để nâng cao hiểu biết của bản thân về lĩnh vực VSV học môi trường và ứng dụng VSV vào bảo vệ và phát triển môi trường bền vững.

0.2. LỊCH SỬ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG

0.2.1. Lịch sử nghiên cứu

Lịch sử phát triển của ngành vi sinh vật học môi trường có thể chia thành bốn giai đoạn:

0.2.1.1. Giai đoạn trước Pasteur (1865)

Các quá trình chuyển hóa các chất trong tự nhiên đã được con người biết đến từ lâu, nhưng ban đầu chủ yếu là những ứng dụng ngẫu nhiên, theo kinh nghiệm. Về sau, Antonie van Leeuwenhoek (1632 – 1723) đã sử dụng những chiếc kính hiển vi thủ công tay làm và trở thành người đầu tiên quan sát thấy các “animalcules” (những động vật nhỏ bé), ngày nay được gọi là "Vi sinh vật".

Từ xa xưa, con người đã biết ứng dụng một số quá trình lên men phân giải cơ chất vào đời sống: làm mắm, làm tương, muối chua rau quả, ủ phân... Cuối giai đoạn này, con người đã biết ứng dụng lên men hiếu khí để ủ phân bón, sản xuất giấm, từ đó đã phát triển một bước lớn trong lĩnh vực nuôi cấy vi sinh vật và vệ sinh môi trường. Ở giai đoạn này, con người khai thác, lợi dụng tài nguyên thiên nhiên không hợp lý làm xấu hóa chất lượng môi trường.

0.2.1.2. Giai đoạn từ 1865 – 1940

Những đóng góp chính cho sự phát triển của giai đoạn này tập trung nhất vào các công trình của nhà bác học người Pháp Louis Pasteur (1822 – 1895). Đồng thời và tiếp theo Pasteur cũng có nhiều nhà vi sinh học nổi tiếng như:

- Robert Koch (1843 – 1910) nghiên cứu vi khuẩn gây bệnh lao (*Mycobacterium tuberculosis*, 1882), bệnh tả (*Vibrio cholerae*, 1883). Ông đã sáng tạo nhiều phương pháp nghiên cứu như kỹ thuật cố định, nhuộm màu vi khuẩn, nuôi cấy và phân lập vi sinh vật trên môi trường đặc.
- Năm 1884, Elie Metchnikoff (1845 – 1916) miêu tả hiện tượng thực bào (phagocytosis); Hans Christian J. Gram (1853 – 1938) tìm ra phương pháp nhuộm Gram.
- Năm 1892, Dmitri Iwanowski (1864 – 1920) phát hiện ra mầm bệnh nhỏ hơn vi khuẩn (virus) gây bệnh khâm ở cây thuốc lá.
- Năm 1894, Alexandre Yersin (1863 – 1943) và Kitasato Shibasaburo (1852 – 1931) khám phá ra vi khuẩn gây bệnh dịch hạch (*Yersina pestis*).

Đặc biệt trong giai đoạn này, nhiều nghiên cứu phát hiện thêm quá trình lên men lactic và ứng dụng rộng rãi quá trình này vào đời sống thực tiễn. Phát triển nuôi cấy thu sinh khói bằng cách thổi không khí vào môi trường lỏng; công nghiệp sản xuất glycerol, acetone, butanol phát triển mạnh mẽ; các thiết bị lên men được hoàn thiện dần. Trong giai đoạn này, người ta đã biết khử trùng không khí trước khi cung cấp cho các quá trình lên men hiếu khí.

0.2.1.3. Giai đoạn 1940 – 1970

Quá trình sản xuất kháng sinh được phát hiện, đặc biệt là quá trình sản xuất penicillin, sinh khối giàu protein. Bên cạnh đó đã sản xuất được vitamin B₁₂ và riboflavin, hoàn thiện công nghệ sản xuất kháng sinh và bắt đầu công nghệ sản xuất amino acid và enzyme. Đây cũng là giai đoạn hoàn thiện toàn bộ thiết bị lên men. Quá trình lên men được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực y học, nông nghiệp, bảo vệ môi trường...

0.2.1.4. Giai đoạn từ năm 1970 đến nay

Được đánh dấu bằng sự phát hiện ra các enzyme cắt giới hạn restrictase là loại enzyme có khả năng nhận biết đoạn trình tự nucleotide đặc hiệu trên các phân tử DNA và cắt cả hai sợi DNA bỗng sung tại các vị trí đặc thù của Daniel Nathans (1928 – 1999), Werner Arber (1929 –), Hamilton O. Smith (1931 –). Temin và Baltimore phát hiện các plasmid tái tổ hợp với sự gắn các gene lạ mang các thông tin tổng hợp các protein đặc biệt vào một cơ thể đã trở thành một phương pháp thông dụng và sự kiểm soát ngày càng tốt hơn sự biểu hiện của các gene này. Tuy nhiên, giai đoạn này với đặc trưng là sự tăng dân số, đô thị hóa và công nghiệp hóa phát triển nhanh đã gây ra sự ô nhiễm môi trường và phá hoại hệ sinh thái trong phạm vi rộng lớn. Môi trường sống ngày càng bị suy thoái nghiêm trọng.

Các sự kiện lịch sử quan trọng của vi sinh vật học môi trường được tóm tắt như sau:

- Antonie van Leeuwenhoek lần đầu tiên quan sát vi khuẩn bằng kính hiển vi thủ công vào năm 1674.
- Louis Pasteur khám phá ra vai trò của vi sinh vật là tác nhân lên men vào năm 1857.
- Robert Koch sử dụng đĩa thạch để đếm số lượng vi sinh vật đất vào năm 1881.
- Hellriegel và Wilfarth khám phá quá trình cố định đạm trên nốt sần ở các cây họ đậu vào năm 1885.
- Beijerinck và Winogradsky sử dụng các phương pháp làm giàu môi trường có chọn lọc để phân lập các chủng vi sinh vật thuần khiết có khả năng cố định đạm, oxy hóa hợp chất ammoniac thành nitric acid và cố định nitơ của các vi sinh vật cộng sinh và độc lập.
- Ghi nhận các quần thể đa dạng ở trong đất như: vi khuẩn, nấm, tảo, sinh vật đơn bào, giun tròn, ái trùng chân khớp.
- Nhà khoa học người Nga Omelianskii lần đầu tiên phân lập được loài vi khuẩn *Methanobacillus omelianskii* có khả năng phân giải cellulose trong điều kiện kỵ khí năm 1902.
- Cornelius Bernardus Van Niel và cộng sự nghiên cứu vi khuẩn có khả năng sử dụng sulfur năm 1931.

- Fred và cộng sự mô tả các đặc trưng của vi khuẩn nốt sần cây họ đậu vào năm 1932.
- Phát hiện và phát triển kháng sinh mới.
- Phương pháp quan sát trực tiếp các vi sinh vật môi trường dưới kính hiển vi nhờ quá trình nhuộm và cố định tiêu bản.
- Phát triển kỹ thuật đánh dấu phóng xạ.
- Đa dạng hóa các tiến bộ trong phân tích hóa học để định tính cũng như định lượng các hợp chất hóa học trong môi trường.
- Phát triển phân loại sinh học phân tử bởi Woese năm 1977 và Pace năm 1997.
- Áp dụng các phương pháp phân tử trong vi sinh vật môi trường bởi Olsen và cộng sự năm 1986, Pace và cộng sự năm 1986; Amann và cộng sự các năm 1991 và 1995; Ward và cộng sự năm 1993; White năm 1994; van Elsas và cộng sự năm 1997; Madigan và Martinko năm 2006....

0.2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu chủ yếu được sử dụng là phân tích, đánh giá môi trường các vùng lanh thổ, sử dụng các công cụ tin học, hệ thông tin địa lý và kỹ thuật viễn thám trong nghiên cứu môi trường, đánh giá tác động môi trường các hoạt động kinh tế, xã hội; quy hoạch môi trường. Tiến hành quan sát, thu mẫu tại các điểm thực địa lựa chọn và thực nghiệm tại phòng thí nghiệm. Các phương pháp trên thường tạo ra các chế phẩm ở ba mức độ:

- Nghiên cứu trên từng đối tượng vi sinh vật cụ thể.
- Nghiên cứu tác động của vi sinh vật đến sự biến đổi môi trường tại một khu vực, vùng lanh thổ cụ thể trong hệ sinh thái.
- Nghiên cứu các đặc điểm sinh học, tạo chế phẩm vi sinh tại phòng thí nghiệm.

Các đối tượng vi sinh vật thường được tiến hành nghiên cứu trong thời gian ngắn, gọi là phương pháp cấp diễn. Còn chế phẩm tiến hành nghiên cứu trong thời gian dài, gọi là phương pháp trường diễn.

Phương pháp khoa học gồm các bước cơ bản. Sau khi thu mẫu và quan sát một vài hiện tượng trong môi trường tự nhiên, một giả thiết sẽ được đưa ra. Để biến giả thiết thành giả thiết khoa học, nó được chứng minh bằng các thực nghiệm và quan sát. Nếu giả thiết đưa ra phù hợp với thực nghiệm và quan sát thì sẽ có kết luận và được nêu thành một luận thuyết khoa học.

Trong phương pháp khoa học, các số liệu thu được phải được lượng hóa bằng cách đo lường từ các nhóm thực nghiệm và các nhóm đối chứng. Các kết quả và số liệu thu được sẽ xử lý bằng phương pháp toán học thống kê có ý nghĩa.

0.3. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG

0.3.1. Vai trò của vi sinh vật trong tự nhiên

Vật chất trong tự nhiên luôn tuần hoàn: chuyển từ dạng vô cơ sang dạng hữu cơ và ngược lại. Trong quá trình tuần hoàn ấy, các cơ thể sống được chia thành ba nhóm tùy theo vai trò của chúng:

Toàn bộ cây xanh và các vi sinh vật quang dưỡng tổng hợp các chất hữu cơ từ carbon dioxide nhờ sử dụng năng lượng mặt trời, nên được gọi là *sinh vật sản xuất*.

Toàn bộ động vật sử dụng phần lớn sinh khối sơ cấp vào việc tạo ra năng lượng và một phần nhỏ vào việc tổng hợp sinh khối của chúng, nên được gọi là *sinh vật tiêu thụ*.

Nấm và vi khuẩn có vai trò tích cực trong sự phân hủy chất hữu cơ của mọi động vật, thực vật thành chất vô cơ (sự vô cơ hóa hay sự khoáng hóa, mineralization), do đó được gọi là *sinh vật phân hủy*. Nấm đóng vai trò này trong môi trường đất, còn vi khuẩn trong cả môi trường đất và môi trường nước.

Như vậy, các cơ thể sống tham gia vào sự tuần hoàn vật chất trong tự nhiên bằng cách làm cho vật chất ấy tuần hoàn từ dạng vô cơ sang dạng hữu cơ và ngược lại, thông qua các phản ứng khử và phản ứng oxy hóa. Các phản ứng khử và oxy hóa do các cơ thể sống thực hiện ấy cùng các quá trình không sinh học dẫn đến chu trình sinh địa hóa (biogeochemical cycles) là sự tuần hoàn của toàn bộ các nguyên tố trong nội bộ một phần hoặc giữa các phần của hệ sinh thái khổng lồ của chúng ta (Trái Đất), gồm khí quyển, thủy quyển, thạch quyển và sinh quyển.

0.3.2. Vai trò của vi sinh vật trong đồi sống và sản xuất của con người

Chính nhờ sự vô cơ hóa chất hữu cơ mà các nguyên tố trong chất hữu cơ được trở về dạng vô cơ để trả về cho khí quyển và cho đất hay nước, do đó, sự sống không bị ngừng trệ. Nhiều khí vô cơ được trả về khí quyển, trong đó CO₂ được dùng cho cây xanh thực hiện quang hợp, nhiều chất vô cơ được trả về đất và nước như N, P, S được cơ thể sống hấp thụ để tổng hợp trở lại các chất hữu cơ.

Cũng chính bằng sự vô cơ hóa mà vi sinh vật tham gia vào sự tự làm sạch các thủy vực bị ô nhiễm hữu cơ ở mức vừa phải, cũng như tham gia vào sự phân hủy xác sinh vật và chất hữu cơ vẫn luôn xảy ra trong đất, làm cho mặt đất chúng ta đang sống nói chung không bị ngập tràn trong xác động, thực vật đến không còn nơi để sống. Mặt khác, sự vô cơ hóa nhờ VSV là cơ sở của hầu hết các quá trình phục hồi sinh học (bioremediations) đối với các môi trường nước và đất.

Khi con người và động vật tiếp xúc với môi trường mang vi sinh vật gây bệnh, độc tố của chúng sẽ gây ra nhiều bệnh cho cơ thể, có thể để lại hậu quả nghiêm trọng, thậm chí dẫn đến tử vong. Các bệnh thường gặp là thương hàn do vi khuẩn *Salmonella*, tả do *V. cholerae*, ly do *Shigella*, lao do *Mycobacterium*... Ngoài ra còn có thể dẫn đến các

triệu chứng ngộ độc nghiêm trọng nếu chúng ta ăn phải độc tố của vi khuẩn như độc tố botulinum của vi khuẩn độc thịt *Clostridium botulinum*, độc tố enterotoxin của vi khuẩn tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*...

Trong thực tế đời sống hiện nay, người ta đã biết lợi dụng những biến đổi có lợi của vi sinh vật để tạo ra những sản phẩm, chế phẩm có chất lượng và phù hợp hơn cho nhu cầu ngày càng cao của con người. Như sử dụng sinh khối vi sinh vật làm nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng, ứng dụng các quá trình lên men rộng rãi trong việc sản xuất các loại thực phẩm quan trọng như: rượu, bia, nước giải khát, bánh mì, nước mắm, mì chính..., cũng như làm tăng giá trị dinh dưỡng của các loại thực phẩm như tempeh, natto... được lên men từ đậu nành.

Sản xuất các loại phân bón vi sinh, thuốc trừ sâu vi sinh thay thế cho các loại phân bón, thuốc trừ sâu hóa chất độc hại.

0.4. ĐỊNH HƯỚNG NGHIÊN CỨU VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG VIỆT NAM

Lĩnh vực vi sinh vật học môi trường hiện đang tập trung nghiên cứu theo ba nhóm định hướng chính:

0.4.1. Nghiên cứu cơ bản

- Phân lập và tuyển chọn chủng giống vi sinh vật môi trường.
- Lưu giữ và bảo quản các chủng giống có năng suất, chất lượng tốt.
- Nghiên cứu cấu trúc vi sinh vật, di truyền và cải biến chủng giống vi sinh vật.
- Nghiên cứu cơ chế lên men của vi sinh vật làm cơ sở cho nghiên cứu công nghệ lên men sản xuất chế phẩm vi sinh vật.
 - Nghiên cứu sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật để áp dụng vào xử lý, cải tạo môi trường.
 - Nghiên cứu đa dạng và sinh thái của vi sinh vật nhằm ứng dụng trong lĩnh vực quan trắc và xử lý ô nhiễm môi trường.

0.4.2. Nghiên cứu ứng dụng và triển khai kỹ thuật

- Nghiên cứu xây dựng các quy trình lên men phát triển sinh phẩm và công nghệ từ vi sinh vật môi trường chất lượng cao thay thế các công nghệ và sinh phẩm nhập ngoại (như enzyme, probiotic cho người và vật nuôi, chế phẩm vi sinh vật khác) phục vụ nông – ngư nghiệp và môi trường.
 - Phát triển, tiếp cận và ứng dụng công nghệ cao về protein, enzyme, công nghệ gene và kỹ thuật nano nhằm tạo ra các sinh phẩm cao cấp phục vụ trong y – dược, bảo vệ môi trường.

– Kết hợp thành tựu nghiên cứu vi sinh vật, công nghệ lên men, sinh học phân tử để phát triển các chế phẩm vi sinh mới phục vụ nhu cầu trong nước và xuất khẩu như: màng sinh học, nhựa sinh học, nhiên liệu sinh học và các dung môi hữu cơ có giá trị khác.

0.4.3. Xúc tiến hoạt động chuyển giao công nghệ tiên tiến

Xúc tiến hoạt động chuyển giao công nghệ sản xuất và ứng dụng các chế phẩm vi sinh vật phục vụ cho xử lý ô nhiễm môi trường, sản xuất nông lâm ngư nghiệp... mang lại hiệu quả kinh tế và xã hội.

0.5. VỊ TRÍ VI SINH VẬT TRONG SINH GIỚI

0.5.1. Một số hệ thống sinh giới

Giới (*Regnum*) là đơn vị phân loại hiện nay bao gồm những sinh vật có chung những đặc điểm nhất định. Các hệ thống phân loại sinh vật là kết quả của hơn 200 năm nghiên cứu về hệ thống học.

Hệ thống các cơ thể ngày càng hợp lý nhờ những hiểu biết sâu sắc về sinh học phân tử. Ngày nay, nhờ các phương pháp phân loại hiện đại như: hóa phân loại (*Chemotaxonomy*), phân loại số (*Numerical taxonomy*), phân loại chủng loại phát sinh (*Phylogeny taxonomy*)... mà khoa học đã xác định khá chính xác vị trí của các nhóm cơ thể và mối liên hệ chủng loại phát sinh giữa chúng.

Bảng 0.1. Một số hệ thống phân loại

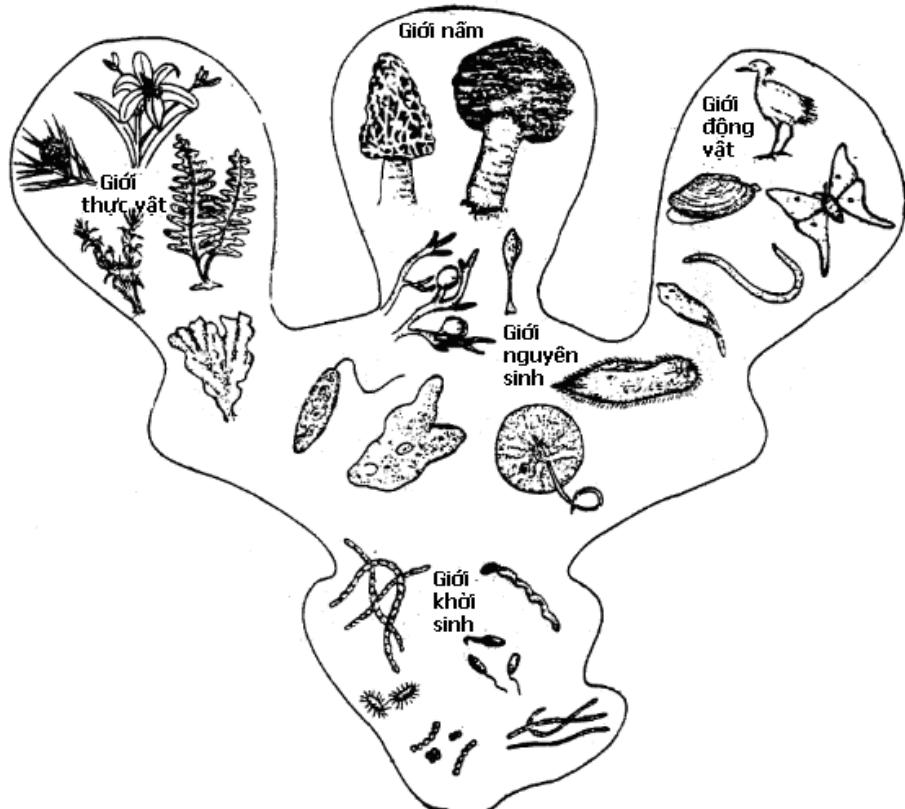
Hệ thống	Giới	Sinh vật bao gồm	Đặc điểm phân loại
Linnaeus (1735)	Vegetabilia	Nấm, tảo, thực vật	Hình thái, cấu tạo, sinh sản
	Animalia	ĐVNS, động vật bậc cao	
Haeckel (1865)	Plantae	Tảo đa bào, thực vật	Kiểu dinh dưỡng
	Animalia	Động vật	
	Protista	Vi khuẩn, ĐVNS, nấm men, nấm sợi	
Whittaker (1969) (hình 0.2)	Plantae	Tảo đa bào, thực vật	Trình tự rRNA
	Animalia	Động vật	
	Fungi	Nấm	
	Protista	ĐVNS, sinh vật nhân chuẩn đơn bào	
	Monera	Vi khuẩn và vi khuẩn lam	
Woese (1977) (hình 0.3)	Bacteria	VK thường gặp sống trong tự nhiên	
	Archaea	VK sống trong môi trường đặc biệt: khí khí, muối cao hay nhiệt độ cao, pH thấp	
	Eucarya	ĐVNS, nấm, tảo, thực vật, động vật	

Đa số vi sinh vật là đơn bào và ít phân hóa về hình thái. Do đó, theo Linnaeus, chúng nằm phân lớn trong giới Vegetabilia (giới thực vật), phân nhỏ trong Animalia (giới động vật) (bảng 0.1). Theo Haeckel, chúng lại được xếp trong giới Protista (giới nguyên sinh). Whittaker với hệ thống phân loại năm giới thì tách VSV vào ba giới: Monera (giới khởi sinh), Protista và Fungi (hình 0.2). Còn Woese chia VSV vào hai giới vi khuẩn và vi khuẩn cổ, một phần trong giới Eukaryote (ĐVNS, nấm và tảo).

Các đặc điểm căn cứ để phân loại ở các hệ thống phân loại là không giống nhau: Linnaeus, Haeckel dựa chủ yếu vào đặc điểm hình thái, Whittaker thì lấy kiểu dinh dưỡng, Woese dựa vào trình tự rRNA.

Theo đề nghị của nhà bác học Thụy Điển C. Linnaeus (1707 – 1778), hội nghị quốc tế các nhà sinh vật học đã thông qua hệ thống các đơn vị phân loại sinh vật từ thấp lên cao như sau:

Loài (Species), Chi (Genus), Họ (Familia), Bộ (Ordo), Lớp (Classis), Ngành (Phylum) và Giới (Regnum). Hiện nay, trên giới còn có một mức phân loại nữa gọi là Lĩnh giới (Domain). Đó là chưa kể đến các mức phân loại trung gian thấp hơn có tiền tố (Sub-) hay cao hơn (Super-)... Nhờ có hệ thống phân loại sinh vật mà người ta có thể biết vị trí của mỗi cá thể trong cây phát sinh từng nhóm sinh vật.



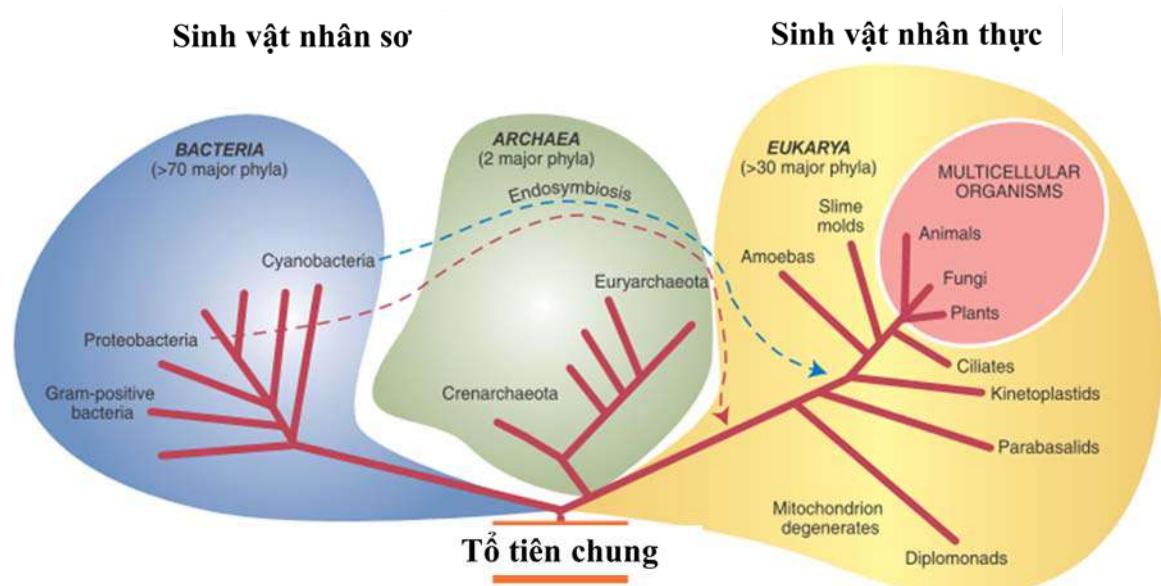
Hình 0.2. Hệ thống phân loại năm giới của R. H. Whittaker (1920 – 1981).

Loài: là đơn vị cơ bản của hệ thống các đơn vị phân loại kể trên. Nó tập hợp các cá thể sinh sống trong một khoảng không gian xác định, giống nhau về các dấu hiệu hình thái, sinh học và sinh thái. Các cá thể của loài này cách biệt về phương diện sinh sản với các cá thể của loài khác.

Giống: bao gồm một hoặc là tập hợp của một số loài có nhiều đặc điểm chung và có điều kiện sống gần giống nhau. Tương tự như vậy, một giống hoặc tập hợp của một số giống gần gũi tạo thành một họ; một hoặc tập hợp của một số họ gần gũi – một bộ; một hoặc tập hợp của một số bộ gần gũi – một lớp; một hoặc một tập hợp của một số lớp gần gũi – một ngành; tập hợp của một số ngành gần gũi – một giới.

Để tránh nhầm lẫn, người ta đặt tên loài theo nguyên tắc dùng tên kép (theo tiếng Latinh). Tên thứ nhất là tên chi (viết hoa), tên thứ hai là tên loài (viết thường), ví dụ: *Escherichia coli*. Khi cần viết tắt ta chỉ viết tắt tên chi, tên loài viết đầy đủ (bằng chữ thường), ví dụ: *E. coli*. Một loài bất kỳ chưa được định tên thì thường viết tắt là "sp." còn số nhiều là "spp.". Thông thường tên chi và loài in chữ nghiêng.

Vào những năm 1970, các kỹ thuật sinh học phân tử phát triển cho phép phân tích trình tự nucleic acid, bao gồm các RNA ribosome với các cấu trúc bảo toàn cao được sử dụng trong tổng hợp protein của sinh vật. Dựa vào kết quả phân tích trình tự rRNA 16S, Carl Woese đã phân ra một giới sinh vật mới là vi khuẩn cổ – Archaea, từ đó đưa ra hệ thống phân loại hiện đại gồm ba giới: Bacteria, Archaea và Eukarya (hình 0.3). Hiện tại, các tài liệu về phân loại tại Hoa Kỳ sử dụng hệ thống 6 giới: Animalia – Động vật, Plantae – Thực vật, Fungi – Nấm, Protista – Sinh vật Nguyên sinh, Archaea – Vi khuẩn cổ, Bacteria – Vi khuẩn. Trong khi đó, các tài liệu tương tự tại Anh và Australia lại sử dụng hệ thống năm giới: Animalia – Động vật, Plantae – Thực vật, Fungi – Nấm, Protista – Sinh vật Nguyên sinh, Monera – Giới Khởi sinh.



Hình 0.3. Cây phát sinh chủng loại chung của sinh giới dựa vào trình tự rRNA.
(Woese, 1977) (Jeffrey et al., 2011).

0.5.2. Vi sinh vật là một hợp phần của môi trường sống

Vi sinh vật do có kích thước hiển vi và do có nhiều khả năng sinh học rất đặc biệt mà tồn tại ở hầu khắp mọi nơi trên Trái Đất: ngay xung quanh chúng ta (đất, nước, không khí, đồ dùng, thực phẩm...) và ngay trên bề mặt cơ thể, trong cơ thể chúng ta (trên da, trong xoang miệng, xoang ruột...).

Trong tự nhiên, ở những môi trường bình thường – nơi có các điều kiện thuận lợi cho hầu hết cơ thể sống (về chất dinh dưỡng, nhiệt độ, pH, oxy...) – thì có một khu hệ vi sinh vật phong phú về chủng loại và đông đúc về số lượng. Ví dụ: trong 1 gam đất ở tầng canh tác có thể có tới khoảng hơn 20 tỷ vi khuẩn, vài chục triệu vi nấm, vài chục nghìn vi tảo; trên cơ thể chúng ta, trong 1 cm² da của vùng trán có thể có tới bốn mươi nghìn vi khuẩn *Staphylococcus epidermidis*, còn ở vùng các ngón chân thì số vi khuẩn này là hơn một triệu; đó là chưa kể các vi sinh vật khác.

Đặc biệt ở những môi trường khắc nghiệt (*extreme environments*), nơi mà mọi động vật và thực vật không thể tồn tại cũng vẫn có một số vi sinh vật sinh trưởng. Các môi trường cực trị ấy là những nơi có một hay nhiều điều kiện rất khắc nghiệt như nhiệt độ rất cao hoặc rất thấp, pH rất acid hoặc rất kiềm, độ mặn cao, áp suất cao, nghèo dinh dưỡng, không có oxy...

Riêng về nhiệt độ, những giới hạn trên về nhiệt độ đối với vi khuẩn cổ (Archaea), vi khuẩn (Bacteria) và vi sinh vật có nhân thực (*eukaryotic microorganisms*) là 113, 95, và 62 °C, theo thứ tự, trong khi đó hầu hết động vật và thực vật không thể sinh trưởng ở trên 50 °C.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Vi sinh vật học môi trường (*Environmental microbiology*) là một ngành khoa học nghiên cứu về những hoạt động sinh lý của VSV có ảnh hưởng đến chất lượng của môi trường.

Vi sinh vật học môi trường nghiên cứu về vi sinh vật trong tất cả các loại môi trường sống (đất, nước, không khí, sinh vật và môi trường cực trị) và sự tác động có lợi cũng như có hại của chúng đến sức khỏe và phúc lợi của con người. Vi sinh vật học môi trường có mối liên hệ mật thiết với các môn khoa học khác như công nghệ sinh học, an toàn thực phẩm, xử lý sinh học các chất thải độc hại, vi sinh vật chẩn đoán...

Người ta chia lịch sử nghiên cứu ngành Vi sinh vật học môi trường ra bốn giai đoạn:

- Giai đoạn trước Pasteur (1865): Con người khai thác, lợi dụng tài nguyên thiên nhiên không hợp lý làm xáo hóa chất lượng môi trường,
- Giai đoạn từ 1865 đến 1940: Biết phát triển kỹ thuật nuôi cây VSV môi trường.

– Giai đoạn từ 1940 – 1970: Úng dụng các quá trình sản xuất lên men tạo chế phẩm ứng dụng trong bảo vệ, cải tạo môi trường.

– Giai đoạn từ 1970 đến nay: Dân số tăng nhanh, đô thị hóa và công nghiệp hóa gây ô nhiễm môi trường, phá hoại hệ sinh thái trong phạm vi rộng lớn. Môi trường sống ngày càng suy thoái nghiêm trọng; các phương pháp nghiên cứu phân tử trong vi sinh vật môi trường được nhiều nhà khoa học thực hiện như Olsen và cộng sự năm 1986; Amann và cộng sự các năm 1991 và 1995; Ward và cộng sự năm 1993; White năm 1994; van Elsas và cộng sự năm 1997; Madigan và Martinko năm 2006....

Vi sinh vật môi trường là một ngành khoa học mới phát triển, nhưng do ý nghĩa quan trọng của nó về lý luận cũng như thực tiễn nên sẽ phát triển hết sức nhanh chóng trong thế kỷ XXI.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Vi sinh vật môi trường là gì? Yêu cầu, nội dung của môn học?
2. Lịch sử phát triển của vi sinh vật học môi trường?
3. Những tác động của vi sinh vật trong môi trường tự nhiên?
4. Tại sao nói vi sinh vật là một hợp phần của môi trường?
5. Một số định hướng hiện nay trong nghiên cứu vi sinh vật học môi trường?
* Chọn đáp án đúng nhất
6. Các nhóm vi sinh vật chủ yếu trong môi trường tự nhiên gồm:
 - a. Virus và các thực thể dưới virus;
 - b. Vi khuẩn (Bacteria) và vi khuẩn cổ (Archaea);
 - c. Vi nấm (Microfungi);
 - d. Vi tảo (Microalgae);
 - e. Động vật nguyên sinh (Protozoa);
 - f. Tất cả các nhóm trên.
7. Lĩnh vực vi sinh vật học môi trường Việt Nam hiện đang tập trung nghiên cứu theo các định hướng:
 - a. Nghiên cứu cơ bản về vi sinh vật môi trường.
 - b. Nghiên cứu ứng dụng và triển khai kỹ thuật.
 - c. Xúc tiến hoạt động chuyển giao công nghệ tiên tiến sản xuất và ứng dụng các chế phẩm vi sinh vật phục vụ cho xử lý ô nhiễm môi trường, sản xuất nông nghiệp...
 - d. Cá ba ý trên.

* Diễn vào các chỗ trống

8. Dựa vào trình tự các nucleotide của 16S rRNA và 18S rRNA mà Woese C. R và cộng sự đã xếp toàn bộ các cơ thể sống vào ba lãnh giới (Domains). Đó là.....
9. Các vi sinh vật hoạt động trong các địa điểm vật lý được gọi là..... của chúng.

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. **Môi trường là gì?** Môi trường là hệ thống các yếu tố vật chất tự nhiên và nhân tạo có tác động đối với sự tồn tại và phát triển của con người. (*Luật Bảo vệ Môi trường Việt Nam, 2014*).
2. **Môi trường sống?** Môi trường sống là phần bao quanh sinh vật mà ở đó các yếu tố cấu tạo nên môi trường trực tiếp hay gián tiếp tác động lên sự sinh trưởng, phát triển và những hoạt động khác của sinh vật.
3. **Sinh khối là gì?** Sinh khối là tổng trọng lượng của sinh vật sống trong sinh quyển hoặc số lượng sinh vật sống trên một đơn vị diện tích, thể tích vùng.
4. **Suy thoái môi trường là gì?** Suy thoái môi trường là sự làm thay đổi chất lượng và số lượng của thành phần môi trường, gây ảnh hưởng xấu cho đời sống của con người và thiên nhiên.
5. **Chủng (Strain):** Chỉ một vi sinh vật của một loài mới phân lập. Nó mang theo ký hiệu chi, loài và chủng. Ví dụ *Staphylococcus aureus* ATCC 1259.
6. **Loài (Species):** Theo nghĩa rộng, loài là một nhóm các cá thể sinh vật có những đặc điểm sinh học tương đối giống nhau và có khả năng giao phối với nhau cho con cái hữu thụ.
7. **Chi (Genus):** Một đơn vị phân loại sinh học dùng để chỉ một hoặc một nhóm loài có kiểu hình tương tự và mối quan hệ tiến hóa gần gũi với nhau.
8. **Họ (Familia):** Tập hợp của các CHI gần nhau nhất. Họ có thể chia nhỏ thành các phân họ, các tộc, các phân tộc. Tên họ các vi sinh vật thường có tận cùng là ceae, còn các loài động vật là idae.
9. **Bộ (Ordo):** Bậc phân loại trên HỌ trong hệ thống thang bậc phân loại sinh vật. Là tập hợp của các họ gần nhau nhất. Tên bộ của các vi sinh vật có phần đuôi là –les.
10. **Lớp (Classis):** Tập hợp những BỘ có quan hệ gần nhất.
11. **Ngành (Phylum):** Bậc phân loại trên LỚP trong hệ thống thang bậc phân loại sinh vật. Là tập hợp của các lớp gần nhau nhất. Những ngành có đặc điểm chung nhất được xếp vào một giới.

12. Giới (*Regnum*): Sự phân chia các giới có sự thay đổi rất lớn trong lịch sử phát triển của sinh học. Đầu tiên, Linnaeus (1735) chia thế giới này thành hai giới: Động vật và Thực vật. Haeckel (1866) chia thành ba giới: Động vật, Thực vật và Sinh vật nguyên sinh (*protista*) bao gồm các sinh vật có đặc điểm chung là cơ thể có một tế bào nhân chuẩn (động vật nguyên sinh và tảo đơn bào). Năm 1969, Whittaker chia giới sinh vật ra làm năm giới: Khởi sinh (*monera*), Nguyên sinh (*protista*), Nấm (*fungi*), Động vật (*animalia*) và Thực vật (*plantae*). Năm 1985, Hội các nhà động vật nguyên sinh quốc tế đề nghị tách Động vật nguyên sinh (*protozoa*) ra khỏi Sinh vật nguyên sinh và thành một giới của động vật – phân giới động vật đơn bào (*protozoa*). Carl R. Woese và cộng sự, 1977, đã đề nghị chia thành ba lĩnh giới (Bacteria, Archaea và Eukarya).

Chương 1

VI SINH VẬT NHÂN SƠ

Mục tiêu

- Nắm được các dạng hình thái cơ bản, cấu tạo chung và cấu tạo đặc biệt của các nhóm vi sinh vật nhân sơ.
- Hiểu được vai trò của các nhóm vi sinh vật nhân sơ trong đời sống, sản xuất và bảo vệ môi trường.
- Phân biệt vi khuẩn và vi khuẩn cổ. Ý nghĩa thực tiễn của các nhóm vi khuẩn và vi khuẩn cổ.

1.1. VI KHUẨN (Bacteria)

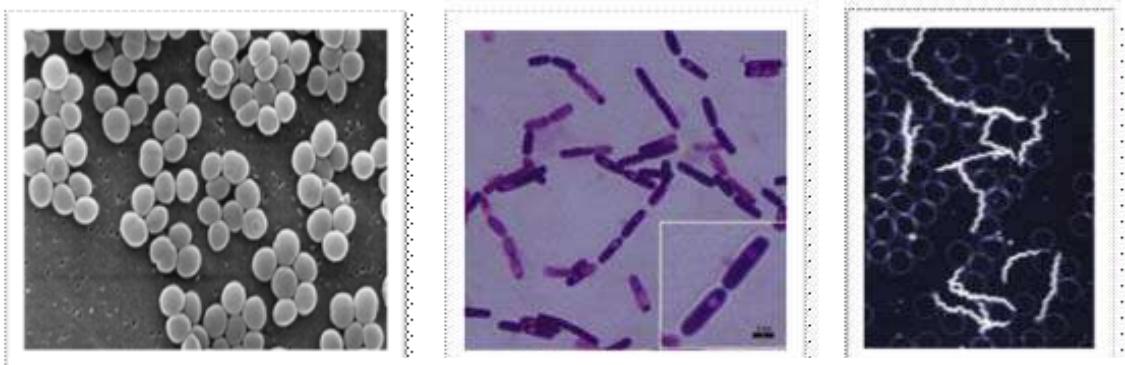
Vi khuẩn là những sinh vật đơn bào, không có màng nhân (procaryote). Thành tế bào chứa peptidoglycan (hay murein), sinh sản chủ yếu theo hình thức phân đôi, chúng có cấu trúc và hoạt động đơn giản hơn nhiều so với các tế bào có màng nhân (eukaryote). Tuy có cấu trúc đơn giản nhất nhưng có khả năng trao đổi chất linh hoạt và có độ đa dạng cao nhất. Vi khuẩn chiếm ưu thế về số lượng trong môi trường. Dựa vào phân tích trình tự vùng bảo toàn của rRNA 16S, 50 ngành vi khuẩn được đánh giá. Gần một nửa số ngành đó chưa được nuôi cấy. Vì vậy, chúng ta nghiên cứu các ngành vi khuẩn môi trường đã được nuôi cấy thành công như: vi khuẩn (Bacteria), vi khuẩn đặc biệt gồm xạ khuẩn (*Actinomycetes*), niêm vi khuẩn (*Myxobacteriales*), xoắn thể (*Spirochaetales*), Rickettsia, Mycoplasma và vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*).

1.1.1. Hình dạng và kích thước

Mỗi loại vi khuẩn có hình dạng và kích thước nhất định. Các hình dạng và kích thước này là do thành tế bào quyết định. Bằng các phương pháp nhuộm và soi kính hiển vi, người ta có thể xác định được hình dạng và kích thước của các vi khuẩn... Để xác định vi khuẩn, hình thái là một tiêu chuẩn rất quan trọng, mặc dù phải kết hợp với các yếu tố khác (tính chất sinh hóa, kháng nguyên, khả năng gây bệnh...).

Kích thước của vi khuẩn được đo bằng micromet $1\mu\text{m} = 10^{-3}$ mm. Kích thước của các loại vi khuẩn khác nhau thì không giống nhau và kích thước của một loại vi khuẩn cũng phụ thuộc vào điều kiện tồn tại của chúng.

Về hình thái, người ta chia vi khuẩn làm ba loại chính: các cầu khuẩn, trực khuẩn và xoắn khuẩn (hình 1.1).

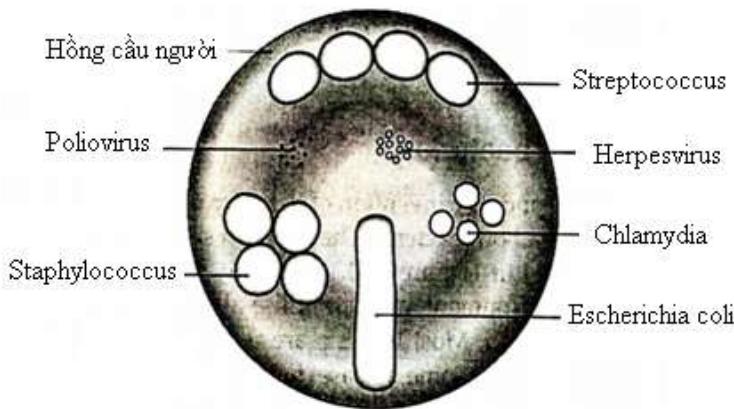


a – Cầu khuẩn

b – Trục khuẩn

c – Xoắn khuẩn

Hình 1.1. Hình dạng một số loại vi khuẩn thường gặp.



Hình 1.2. Tương quan kích thước của các vi sinh vật

Té bào hồng cầu người kích thước 7 – 10 μm , *Staphylococcus* 1 μm ; *E.coli* 1 \times 5 μm ; *Poliovirus* 30 nm, *Herpesvirus* 100 nm.

1.1.1.1. Cầu khuẩn

Là những vi khuẩn hình cầu, mặt cắt của chúng có thể là những hình tròn, hình trứng hay hình hạt cà phê. Đường kính trung bình 1 μm . Cầu khuẩn được chia làm nhiều loại:

- Micrococcus (Đơn cầu): đây là những cầu khuẩn xếp hàng đều hoặc không đều, đó là những tạp khuẩn tìm thấy trong đất, trong không khí và nước.
- Diplococcus (Song cầu): là những cầu khuẩn xếp từng đôi phân chia trong một mảng. Một số gây bệnh cho người như phế cầu, lậu cầu, cầu khuẩn màng não.
- Streptococcus (Liên cầu): là những cầu khuẩn xếp thành chuỗi ngắn hoặc dài. Một số loại gây bệnh cho người như *Streptococcus pyogenes* thuộc nhóm A của Lancefield.
- Tetracoccus (Tứ cầu): các cầu khuẩn Gram dương hợp thành 4, phân chia theo hai mảng, rất ít khi gây bệnh.

– *Sarcina* (Bát cầu): các cầu khuẩn Gram dương xếp thành 8 – 16 tế bào, phân chia theo ba mặt phẳng, thường tìm thấy trong không khí.

– *Staphylococcus* (Tụ cầu): các cầu khuẩn Gram dương hợp thành đám như chùm nho, phân chia theo mặt phẳng, một số loại gây bệnh cho người và động vật. Chúng thường phát triển nhanh chóng tính đẻ kháng với nhiều loại kháng sinh.

1.1.1.2. Trực khuẩn

Là những vi khuẩn có hình que đầu tròn hay vuông kích thước bẹ rộng 1 µm, chiều dài 2 – 5 µm, bao gồm các nhóm:

– *Bacteria*: là những trực khuẩn hiếu khí, không tạo bào tử như vi khuẩn đường ruột *E. coli*, vi khuẩn bạch hầu *Corynebacterium diphtheriae*, vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis*...

– *Bacillus*: là những trực khuẩn hiếu khí tuyệt đối Gram dương tạo bào tử, ví dụ trực khuẩn bệnh than *Bacillus anthracis*, trực khuẩn cỏ khô *Bacillus subtilis*.

– *Clostridium*: là những trực khuẩn kỵ khí Gram dương tạo bào tử, ví dụ trực khuẩn uốn ván *Clostridium tetani*, trực khuẩn ngộ độc thịt *Clostridium botulinum*.

1.1.1.3. Xoắn khuẩn

Xoắn khuẩn là những vi khuẩn hình sợi lượn sóng và di động. Chiều dài của các vi khuẩn loại này có thể tới 30 µm. Trong loại này có ba chi gây bệnh quan trọng là *Treponema* (ví dụ, xoắn khuẩn giang mai *Treponema pallidum*), *Leptospira* và *Borrelia*.

Ngoài những vi khuẩn có hình dạng điển hình trên còn có những loại vi khuẩn có hình dạng trung gian: trung gian giữa cầu và trực khuẩn là cầu – trực khuẩn như vi khuẩn dịch hạch (*Yersinia pestis*); trung gian giữa trực khuẩn và xoắn khuẩn là phẩy khuẩn mà điển hình là phẩy khuẩn tả *Vibrio cholerae*.

Cách sắp xếp của các loại vi khuẩn cũng khác nhau: đứng từng con, từng chuỗi, từng chùm hoặc hình chữ V, chữ N... là do các trực phân bào của chúng.

1.1.2. Cấu trúc của vi khuẩn

Dưới kính hiển vi điện tử, cấu trúc của vi khuẩn gồm các bộ phận sau:

1.1.2.1. Vỏ nhầy (Capsule)

Nhiều vi khuẩn được bao bọc bên ngoài bằng một lớp vỏ nhầy (lớp glycocalyx) có bản chất hóa học là polysaccharide, protein và thậm chí có cả DNA ngoài (eDNA), ngoại trừ vi khuẩn than là polypeptide. Khi làm khô, người ta xác định được 90 – 98% trọng lượng của vỏ nhầy là nước. Vi khuẩn *Acetobacter xylinum* có vỏ nhầy cấu tạo bởi cellulose. Người ta dùng vi khuẩn này nuôi cấy trên nước dừa để chế tạo ra thạch dừa (Nata de coco).

Khi vi khuẩn mọc trên môi trường đặc (thạch 20%), thường tạo thành các dạng khuẩn lạc: Dạng S (Smooth) – trơn bóng; dạng R (Rough) – xù xì và dạng M (Mucoid) – nhầy nhót.

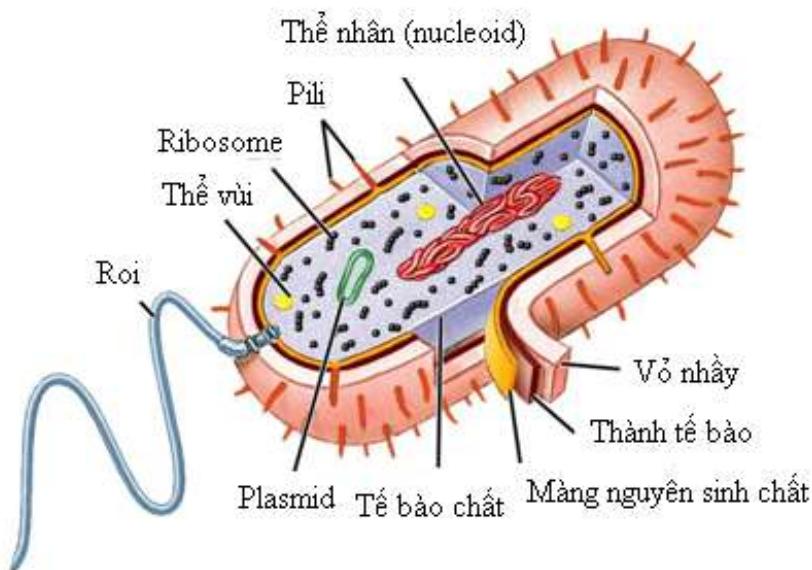
Ý nghĩa sinh học của vỏ nhầy là:

- Bảo vệ vi khuẩn trong điều kiện khô hạn, tránh bị thực bào (trường hợp phế cầu khuẩn – *Diplococcus pneumoniae*).
- Cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn khi thiếu thức ăn.
- Là nơi tích lũy một số sản phẩm trao đổi chất (dextran, xanthan...).
- Giúp vi khuẩn bám vào giá thể (trường hợp các vi khuẩn gây sâu răng như *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*...).

Các loại vỏ nhầy hay giáp mạc (Capsule):

- Vỏ nhầy lớn (Macrocapsule) có bề dày $> 0,2 \mu\text{m}$. Ví dụ: *Leuconostoc mesenteroides*.
- Vỏ nhầy bé (Microcapsule) có bề dày $< 0,2 \mu\text{m}$. Ví dụ: *Pseudomoccus denitrificans*.
- Khối nhầy (Zooglea) dùng trong xử lý nước thải.
- Có những vi khuẩn chỉ hình thành vỏ nhầy trong điều kiện nhất định. Ví dụ *B. anthracis* tạo vỏ nhầy trong môi trường có chứa protein động vật. *Streptococcus pneumoniae* chỉ tạo vỏ nhầy khi xâm nhập vào cơ thể người hay động vật.

Muốn quan sát vỏ nhầy thường làm tiêu bản âm với mực nho, bao nhầy có màu trắng hiện lên trên nền tối.



Hình 1.3. Sơ đồ cấu tạo một tế bào vi khuẩn (Pearson Prentice Hall, 2008).

1.1.2.2. Thành (hay vách) tế bào (cell wall)

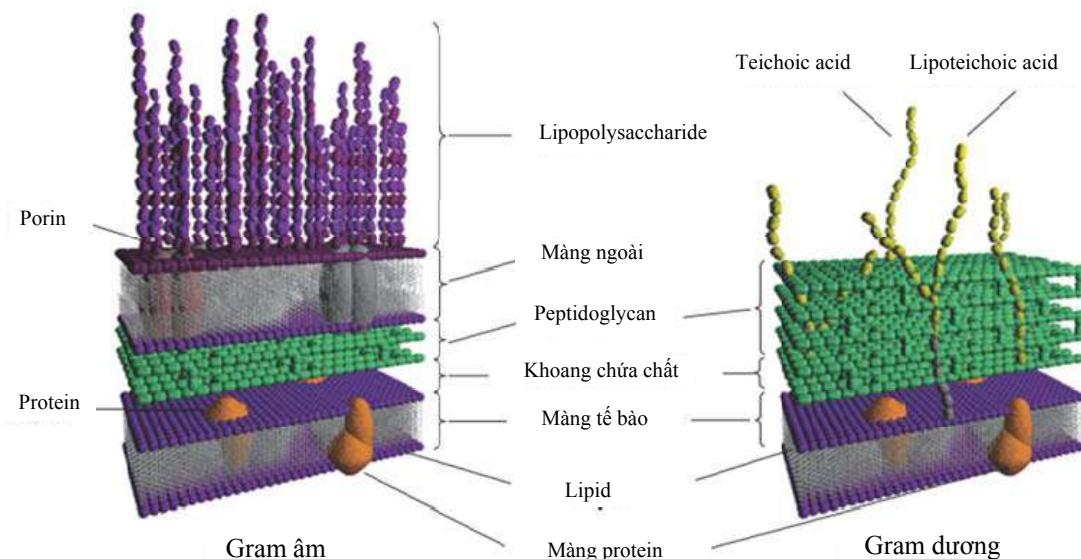
Sự hiện diện của thành tế bào ở vi khuẩn được phát hiện bằng cách nhuộm Gram và bằng phân lập trực tiếp. Tác dụng cơ học như siêu âm phối hợp với ly tâm cho phép thu hoạch thành tế bào ròng, tách rời khỏi sinh chất.

a) Thành tế bào vi khuẩn Gram dương

Kính hiển vi điện tử cho thấy thành tế bào vi khuẩn Gram dương dày từ 15 đến 50 nm. Thành phần chủ yếu là peptidoglycan gọi là murein, một chất trùng hợp mà những đơn vị hóa học là những đường amine. N-acetyl glucosamine và acid N-acetyl muramic và những chuỗi peptide ngắn chứa alanine, acid glutamic và acid diaminopimelic hoặc lysine. Ngoài ra, thành tế bào của một số vi khuẩn Gram dương còn chứa acid teichoic. Ở một vài loại vi khuẩn, acid teichoic chiếm tới 30% trọng lượng khô của thành tế bào.

b) Thành tế bào vi khuẩn Gram âm

Lớp peptidoglycan mỏng hơn khoảng 10 nm và hai lớp lipoprotein và lipopolysaccharide ở bên ngoài, lớp lipoprotein chứa tất cả những amino acid thông thường. Không có teichoic acid, thành tế bào vi khuẩn Gram âm chứa một lượng lipid đáng kể, khoảng 20% trọng lượng khô của thành tế bào.



Hình 1.4. Sơ đồ minh họa cấu trúc thành tế bào vi khuẩn Gram âm và Gram dương
(Pepper et al. 2015, vẽ bởi Wayne L. Miller, McGill University) (xem hình màu 1.4 trang 360).

c) Chức năng của thành tế bào

Thành tế bào vi khuẩn có nhiều chức năng:

- Duy trì hình thể của vi khuẩn: thành tế bào thường cứng tạo nên bộ khung, làm cho vi khuẩn có hình thể nhất định.

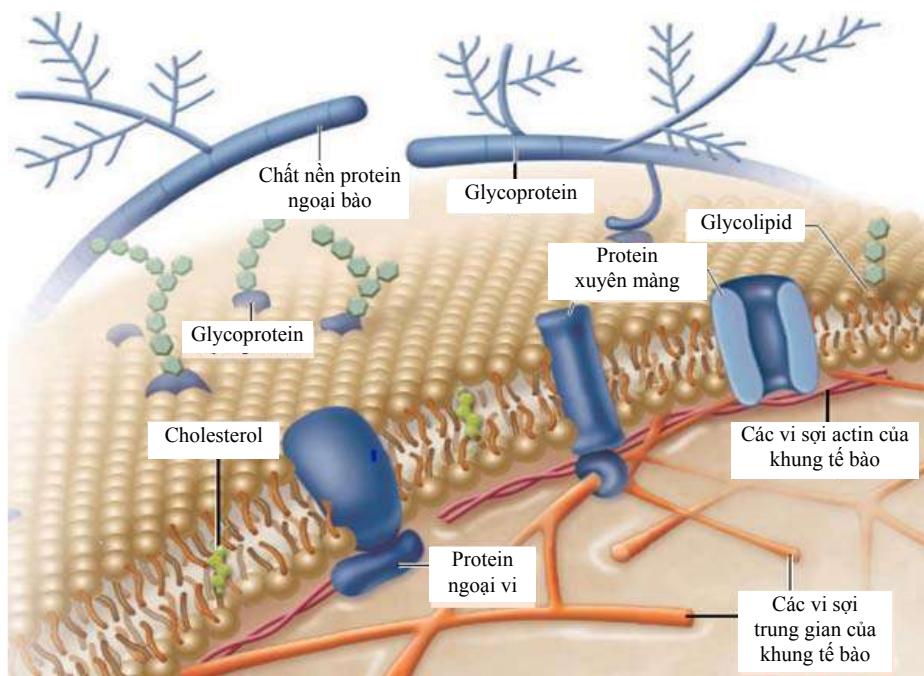
– Quyết định tính bắt màu Gram của vi khuẩn: Sự bắt màu Gram khác nhau ở vi khuẩn Gram dương và Gram âm là do tính thẩm thấu khác nhau đối với cồn của hai nhóm vi khuẩn đó. Nếu dùng lysozyme cắt dây nối β 1-4 glycoside của peptidoglycan thì sẽ biến đổi vi khuẩn Gram dương thành dạng cầu gọi là protoplast (tế bào trần) không có thành tế bào. Ở dạng protoplast, tế bào mất luôn kháng nguyên bề mặt và thụ thể dành cho virus. Tế bào không chết nhưng không sinh sản được. Dưới tác dụng của lysozyme, tế bào Gram âm chỉ mất từng phần thành tế bào, tế bào có dạng cầu gọi là spheroplast. Tế bào vẫn còn kháng nguyên bề mặt và thụ thể của virus nên vẫn sinh sản được và bị virus tấn công.

– Tạo nên kháng nguyên thân O của vi khuẩn đường ruột, để điều chế kháng nguyên O của vi khuẩn đường ruột cần xử lý vi khuẩn không di động bằng nhiệt và cồn.

– Tạo nên nội độc tố của vi khuẩn đường ruột. Nội độc tố chỉ được giải tỏa lúc vi khuẩn bị phân giải. Ở vi khuẩn đường ruột, nội độc tố là những phức hợp lipopolysaccharide dẫn xuất từ thành tế bào.

1.1.2.3. Màng sinh chất (Cytoplasmic membrane)

Là màng bán thấm dày khoảng 10 nm nằm sát thành tế bào. Người ta có thể chứng minh sự hiện diện của nó bằng hiện tượng ly tương hoặc nhuộm với xanh Victoria 4R. Nó chứa 60 – 70% lipid, 20 – 30% protein và một lượng nhỏ carbohydrate. Màng sinh chất có chức năng rào cản thẩm thấu của tế bào, ngăn cản không cho nhiều phẩm vật vào bên trong tế bào nhưng lại xúc tác việc chuyên chở hoạt động của nhiều phẩm vật khác vào bên trong tế bào. Ngày nay, khoa học với các thiết bị nghiên cứu hiện đại đã biết khá rõ cấu trúc màng sinh chất (xem hình màu 1.5 trang 360).



Hình 1.5. Mô hình cấu trúc màng sinh chất (Peter Raven et al., 2017).

Màng sinh chất có nhiệm vụ thẩm thấu chọn lọc vì là nơi chứa enzyme đặc biệt là enzyme chuyển hóa, hô hấp và đóng vai trò kháng nguyên thân đặc hiệu. Màng sinh chất giữ cho vi khuẩn có hình dạng nhất định và giúp vi khuẩn không bị ly giải do áp lực thẩm thấu. Màng sinh chất còn thu nhận thông tin và tham gia điều khiển sự phân chia của tế bào vi khuẩn.

1.1.2.4. Tế bào chất (Cytoplasm)

Tế bào chất của vi khuẩn chứa đựng tới 80% nước dưới dạng gel. Bao gồm các thành phần hòa tan như protein, peptid, các amino acid, vitamine, RNA, ribosomes, các muối khoáng (Ca, Na, P...) và cả một số nguyên tố hiếm.

Protein chiếm tới 50% trọng lượng khô của vi khuẩn và khoảng 90% năng lượng của vi khuẩn để tổng hợp protein. Các enzyme nội bào được tổng hợp đặc hiệu với từng loại vi khuẩn.

Tế bào chất chứa dày đặc những hạt hình cầu đường kính 18 nm gọi là ribosome. Ribosome có chức năng dịch mã mRNA thành các protein. Ribosome của vi khuẩn gồm tiểu phần lớn (50S) và tiểu phần bé (30S). Ngoài ra, còn có thể tìm thấy những hạt dự trữ glycogen, polymetaphosphate. Quá trình nhân đôi của tế bào và tổng hợp protein diễn ra tập trung ở tế bào chất.

Nếu so sánh với tế bào có nhân thực (eucaryote), ta thấy trong tế bào chất của vi khuẩn không có: ti thể, lạp thể, lưới nội chất, bộ máy Golgi và cơ quan phân bào nào.

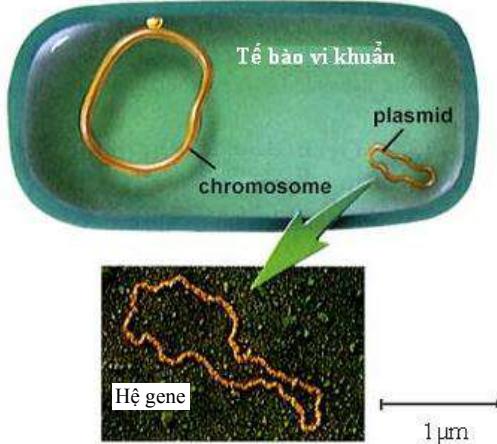
1.1.2.5. Thể nhân (Nuclear body)

Thể nhân (*Nuclear body*) ở vi khuẩn là dạng nhân nguyên thuỷ, chưa có màng nhân nên không có hình dạng cố định, vì vậy còn được gọi là vùng nhân. Khi nhuộm màu tế bào bằng thuốc nhuộm Feulgen hoặc Schiff có thể thấy thể nhân hiện màu tím. Đó là một nhiễm sắc thể (NST, chromosome) duy nhất dạng vòng chứa một sợi DNA xoắn kép (ở Xã khuẩn Streptomyces có thể gấp nhiễm sắc thể dạng thẳng). NST ở vi khuẩn *Escherichia coli* dài tới 1 mm, tức là gấp 500 đến 1000 lần chiều dài của vi khuẩn, được định vị tại một điểm trên màng tế bào chất lúc sắp phân chia và có khối lượng phân tử là 3.10^9 dalton, chứa $4.6.10^6$ pb (cặp base nito). Thể nhân là bộ phận chứa đựng thông tin di truyền của vi khuẩn.

Những nghiên cứu gần đây cho thấy ở một số vi khuẩn cổ ưa nhiệt như *Thermoplasma* đã tìm thấy histol.

1.1.2.6. Plasmid

Plasmid là trình tự DNA ngoài NST có cấu tạo vòng mã hóa các sản phẩm protein giúp tế bào có lợi thế cạnh tranh trong môi trường sống như kháng kháng sinh, kháng kim loại nặng, 2,4-D và một số mã hóa cho các gen gây độc tố trên vi khuẩn gây bệnh. Plasmid được tìm thấy ở nhiều loại vi khuẩn và vi khuẩn cổ. Plasmid thường chỉ được duy trì dưới áp lực chọn lọc, ví dụ như có mặt của kháng sinh để duy trì plasmid mã hóa kháng sinh. Mỗi liên hệ giữa plasmid và NST rất phức tạp bởi vì một số plasmid có thể chèn (cài xen) vào NST trong quá trình nhân đôi và có chức năng như là một phần của NST.



Hình 1.6. Một tế bào vi khuẩn có chứa plasmid và ảnh kính hiển vi điện tử phóng đại hệ gene của plasmid. Đó là một vòng DNA khép kín và thường xoắn cuộn vào nhau.
 (Nguồn: <http://biology.kenyon.edu/>)

Vi khuẩn có thể mang một hoặc nhiều loại plasmid với số lượng khác nhau. Chiều dài plasmid từ 1 đến 1000 kbp. Lợi dụng sự xâm nhập và nhân lên dễ dàng của các plasmid, gần đây người ta đã thực hiện được ghép gene và chuyển gene nhờ plasmid.

1.1.2.7. Mezosome

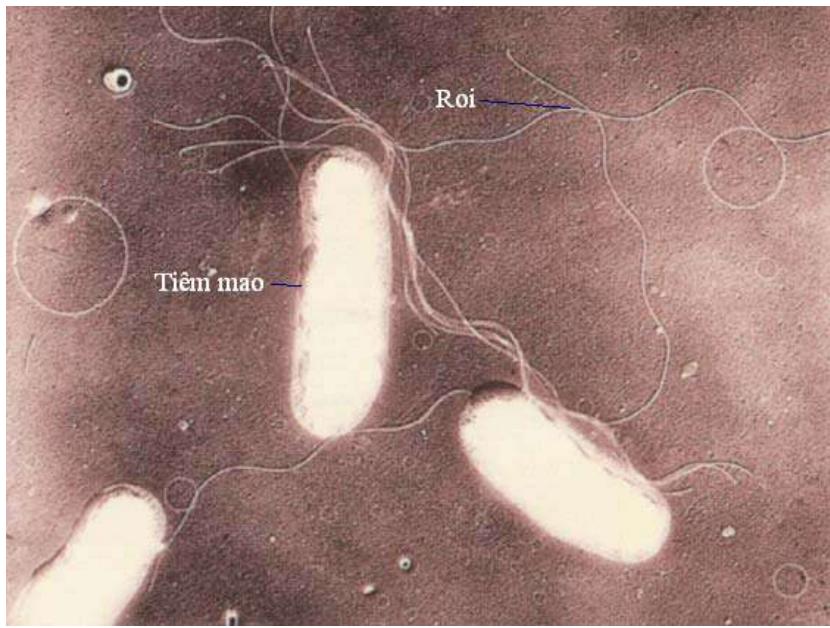
Mezosome là cấu tạo chỉ xuất hiện ở màng sinh chất của tế bào nhân sơ khi sáp phân chia, chính ở vị trí này DNA được cố định. Ở vi khuẩn Gram dương thì mezosome rất phát triển. Ở vi khuẩn Gram âm mezosome chỉ là một nếp nhăn đơn giản. Trong mezosome chứa nhiều enzyme, đặc biệt là các enzyme xúc tác hình thành ATP.

1.1.2.8. Roi (flagellum), tiêm mao (fimbriae), nhung mao (pili)

Một số vi khuẩn có các cấu trúc phụ kéo dài từ lớp màng tế bào ra môi trường xung quanh của tế bào giúp cho vi khuẩn chuyển động hoặc kết dính bề mặt, bao gồm: roi, tiêm mao và nhung mao.

Roi (flagellum): là cấu trúc phụ phức tạp giúp cho vi khuẩn chuyển động. Nhờ roi, vi khuẩn có thể di chuyển một khoảng cách ngắn (μm) hướng đến nơi có chất dinh dưỡng (tính hướng hóa dương tính) cũng như tránh xa hóa chất có hại (tính hướng hóa âm tính). Roi xuất phát từ hạt cơ bản ở tế bào chất qua màng ra ngoài. Về cấu tạo hóa học, roi được cấu tạo bởi protein gọi là flagelin. Các flagelin mang tính chất kháng nguyên gọi là kháng nguyên H. Cách sắp xếp roi là một tiêu chuẩn trong phân loại hình thái (*Morphology taxonomy*) vi khuẩn.

Trong công tác nuôi cấy vi khuẩn, xác định roi cũng là một điểm để phân biệt giữa các loại vi khuẩn. Khi cấy trên mặt thạch, khuẩn lạc của vi khuẩn có roi thường có mép răng cưa hoặc có thùy.



Hình 1.7. Hình chụp kính hiển vi điện tử quét (SEM) của vi khuẩn đất với nhiều roi (Raven et al., 2017).

Tiêm mao (Fimbriae): là cấu trúc phụ, ngắn, có số lượng lớn nằm trên bề mặt tế bào và không giúp cho vi khuẩn chuyển động. Thường có ở vi khuẩn Gram dương (như *S. pyogenes*) và có thể ở một số vi khuẩn Gram âm. Chúng tham gia vào việc bám vào bề mặt tế bào hình thành màng sinh học để bắt đầu quá trình lây nhiễm.

Nhung mao (Pili): thường có số lượng ít hơn tiêm mao nhưng dài hơn tiêm mao. Nhung mao chỉ có ở vi khuẩn Gram âm và nó liên quan đến quá trình tiếp hợp của vi khuẩn. Trong quá trình này, DNA được trao đổi thông qua cầu nối nhung mao giữa 2 tế bào. Tiếp hợp vi khuẩn trong môi trường giúp tăng cường đa dạng vi khuẩn cũng như thích ứng tốt hơn với môi trường.

+ Pili giới tính (F): Ngoài roi, qua kính hiển vi điện tử còn thấy ở vi khuẩn Gram âm có một sợi dài cứng xuất phát từ thành tế bào và tận cùng là một nút. Pili là chỗ bám của phage để phage bơm vật liệu di truyền vào vi khuẩn. Mỗi vi khuẩn có từ 1 – 4 pili giới tính.

+ Pili chung: là những sợi ngắn và thẳng cũng xuất phát từ thành tế bào. Mỗi vi khuẩn có từ 100 – 200 pili chung. Ở một số vi khuẩn, nhờ có pili mà có tính chất gây bệnh, làm cho hồng cầu bị ngưng kết.

1.1.2.9. Nội bào tử vi khuẩn (Bacterial Endospores)

Một số vi khuẩn Gram dương khi gặp điều kiện không thích nghi, chúng hình thành nội bào tử. Nó là một cấu trúc “tạm nghỉ” gồm nhiều lớp màng dày khó thấm, bao ngoài bởi hợp chất calci dipicolinate (DPA–Ca) có tính bền nhiệt, chịu được ánh sáng tử ngoại, chất phân giải và nguồn dinh dưỡng thấp (hình 1.8). Một tế bào vi khuẩn chỉ tạo một nội bào tử nên loại bào tử này không phải là bào tử sinh sản.

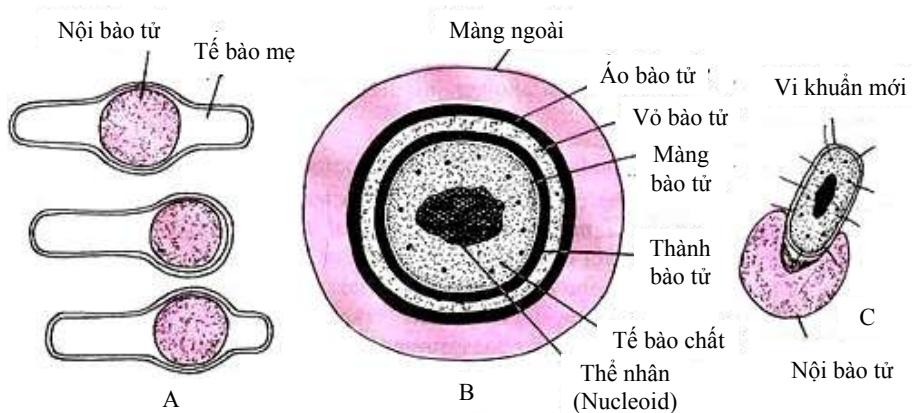
Một hợp chất khác của vỏ bào tử mới tìm thấy là acid L-N-succinyl-glutamic không có trong tế bào sinh dưỡng và chỉ được tổng hợp khi hình thành bào tử, ngay giai đoạn đầu khi hình thành vách ngăn DNA mới với một ít nguyên sinh chất, hợp chất này giúp cho bào tử bền nhiệt.

Tùy theo từng loại vi khuẩn mà nội bào tử nằm ở giữa thân (vi khuẩn than *Bacillus anthracis*), ở một đầu như trực khuẩn uốn ván (*Clostridium tetani*). Khi vi khuẩn bị phân giải thì nội bào tử trở thành tự do, nếu gặp điều kiện thuận lợi, bào tử mọc mầm trở thành trạng thái vi khuẩn sinh dưỡng hoạt động như trước.

Những vi khuẩn có khả năng hình thành nội bào tử gồm nhiều loài thuộc các chi *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus*, *Thermoactinomyces*... Khi hình thành bào tử, tế bào có thể mất đi 70% nước và kích thước bé lại. Bào tử có thể tồn tại rất lâu trong tự nhiên, ví dụ *B. anthracis* có thể sống tiềm sinh trong nhiều năm, trong một số chất độc, trong kháng sinh mà bình thường tế bào sinh dưỡng bị chết rất nhanh.

Khi đưa bào tử vào môi trường thuận lợi để phát triển, bào tử sẽ có hàng loạt thay đổi tích cực và mọc mầm, trải qua ba giai đoạn chủ yếu: hoạt hóa, nứt vỏ và mọc ra.

Muốn quan sát được bào tử, người ta dùng phương pháp nhuộm bào tử của Schaefera và Fulton, M.A. Peskov hoặc phương pháp Ziehl do Muller cải tiến...



Hình 1.8. Nội bào tử vi khuẩn (Manisha, 2013)

A – Vị trí nội bào tử trong tế bào mẹ; B – Cấu trúc của một nội bào tử;
C – Quá trình mọc mầm của nội bào tử.

1.2. VI KHUẨN ĐẶC BIỆT

1.2.1. Xạ khuẩn (Actinomycetes)

1.2.1.1. Đặc điểm của xạ khuẩn

Xạ khuẩn là tên chung để chỉ nhóm VSV đơn bào có hình sợi phân nhánh như nấm nhưng kích thước và cấu trúc giống với vi khuẩn Gram dương. Thành tế bào không chứa

cellulose và chitin mà có glucopeptide dày khoảng 50 μm . Nhân chưa có màng, chất nhân phân tán, chưa có ti thể, lưới nội chất và bộ máy Golgi.

Xạ khuẩn phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Số lượng đơn vị sinh khuẩn lạc (CFU: Colony-forming unit) xạ khuẩn trong 1 g đất thường có $10^6 - 10^8$ CFU.

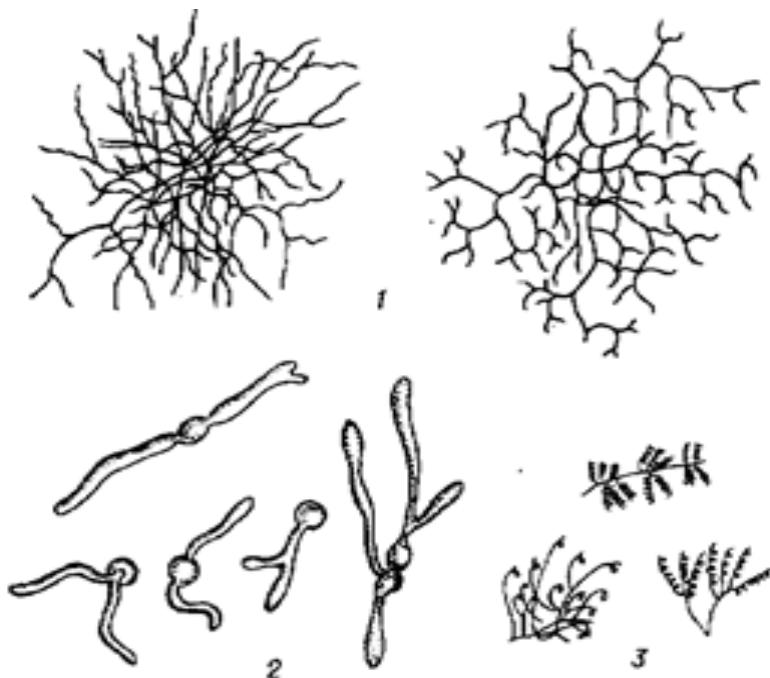
Xạ khuẩn có cấu tạo dạng sợi phân nhánh không có thành ngắn, thường gọi là khuẩn ti, tập hợp nhiều khuẩn ti gọi là khuẩn ti thể, đường kính khuẩn ti từ 0,4 – 0,6 μm (hình 1.9).

Xạ khuẩn sinh sản vô tính bằng một đoạn sợi; bằng bào tử (cắt khúc hay kết đoạn) sinh sản cận hữu tính bằng cách thành lập cầu tiếp hợp.

1.2.1.2. Vai trò của xạ khuẩn

Xạ khuẩn tham gia vào nhiều quá trình chuyển hóa trong tự nhiên của nhiều hợp chất trong đất. Khoảng 80% thuốc kháng sinh thu nhận từ xạ khuẩn. Xạ khuẩn còn có khả năng sinh ra các enzyme, một số vitamin thuộc nhóm B và acid hữu cơ. Đặc điểm này được sử dụng trong nghiên cứu sản xuất các chất kháng sinh dùng trong y học, nông nghiệp, bảo quản thực phẩm.

Sau khi Waskman, 1943, phát hiện ra kháng sinh chống lao Streptomycin từ loài xạ khuẩn *Streptomyces streptomycini* thì nhóm này trở thành trung tâm của các cuộc tìm kiếm những loại kháng sinh mới.



Hình 1.9. Xạ khuẩn chi *Streptomyces*.

1 – Hình dạng khuẩn ti xạ khuẩn; 2 – Bào tử xạ khuẩn nảy mầm;
3 – Cuống sinh bào tử và chuỗi bào tử (Nguyễn Lan Dũng và CS, 2002).

1.2.2. Niêm vi khuẩn (Myxobacterales)

Chúng là những vi khuẩn Gram âm tạo khuẩn lạc nhầy nhót, ký sinh hoặc hoại sinh.

Chu trình sinh sản gồm hai giai đoạn:

- Giai đoạn tế bào sinh dưỡng;
- Giai đoạn bào tử, hình thành quả thể.

Một số loài niêm vi khuẩn đã có nhân phân hóa khá phát triển. Chúng phân bố rất rộng rãi trong đất, trong phân chuồng, trong rác rưởi... Rất nhiều niêm vi khuẩn có khả năng phân giải mạnh mẽ các hợp chất hữu cơ khó phân hủy như cellulose, chitin... Chúng góp phần tích cực vào những quá trình chuyển hóa vật chất trong tự nhiên. Theo Krassilnicov, niêm vi khuẩn bao gồm 5 họ và 13 chi. Trong đó các chi phân giải cellulose được tìm thấy thuộc chi *Promyxobacteria*, *Cytophyta*, *Sporocytophyta*, *Sorangium*.

Vai trò: Niêm vi khuẩn là những vi sinh vật sống hoại sinh, hiếu khí, tiết enzyme phân hủy cellulose, chitin và nhiều chất hữu cơ phức tạp khác. Phân bố rộng rãi trong đất, rác thải hữu cơ, phân chuồng. Chúng góp phần tích cực vào những quá trình chuyển hóa vật chất trong tự nhiên.

1.2.3. Xoắn thể (Spirochaetales)

Chúng là những VSV đơn bào hình sợi xoắn không phân nhánh, chất nhân (nucleoid), tế bào xoắn có thể đi qua các lỗ màng lọc rất nhỏ ($0,2 - 0,5 \mu\text{m}$). Kích thước xoắn thể khác nhau ($0,1 - 0,6 \times 5 - 100 \mu\text{m}$).

Xoắn thể sinh sôi nảy nở theo lối phân cắt ngang, nhưng đôi khi có thể phân cắt theo chiều dọc, một số có thể tạo thành thể qua lọc di động bằng uốn vặn cơ thể. Khi gặp điều kiện thuận lợi, thể qua lọc phát triển thành xoắn thể bình thường.

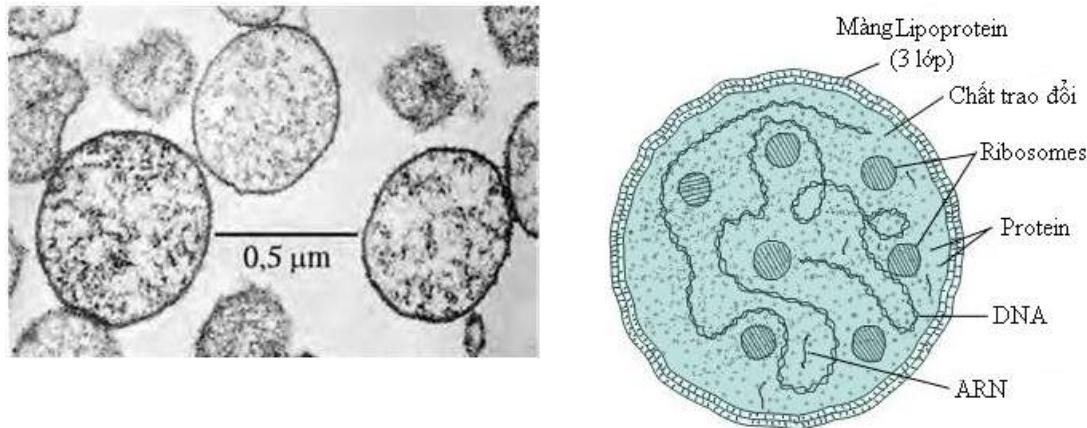
Xoắn thể không sinh bào tử, không hình thành vỏ nhầy và không chứa sắc tố, không có thành tế bào vững chắc, khó nuôi cấy trên môi trường thông thường. Xoắn thể thường gây bệnh cho người và động vật: xoắn thể giang mai (*Treponema pallidum*), sốt hồi quy (*Borrelia recurrentis*). Theo Bergey, xoắn thể gồm 2 họ và 6 chi.

1.2.4. Mycoplasma

Đây là loại VSV nhỏ nhất trong sinh giới có đời sống dinh dưỡng độc lập. Khó nhuộm với thuốc nhuộm kiềm, hình thể khác nhau tùy thuộc vào thời gian nuôi cấy, người ta có thể quan sát bằng kính hiển vi nền đen, nhuộm Giemsa. Mycoplasma có thể phát triển trên môi trường có hoặc không có tế bào sống, hiếu khí hoặc khí tuyệt đối, nhiệt độ thích hợp $35 - 37^{\circ}\text{C}$, pH $7 - 7,8$. Trên môi trường lỏng khó quan sát vi khuẩn mọc vì canh khuẩn trong suốt. Trên môi trường đặc mọc thành khuẩn lạc, mọc lán xuống thạch, rìa khuẩn lạc mỏng và bẹt. Chứa DNA và RNA, tỷ lệ RNA/DNA nhỏ hơn 1. Thuộc loại hiếu khí và hiếu khí không bắt buộc. Chúng phân bố rộng rãi trong tự nhiên, có đời sống hoại sinh, nhiều loại có thể gây bệnh viêm màng phổi (Pleuro-Pneumonia Like

Organisms – PPLO) cho người, gia súc, gia cầm. *Mycoplasma* có hình hạt nhỏ riêng lẻ hay tập trung từng đôi, từng chuỗi ngắn, hình vòng nhẫn, vòng khuyên, là loại Gram âm, có kích thước khoảng 150 – 300 nm. *Mycoplasma* không có thành tế bào, chỉ có màng nguyên sinh chất dày 70 – 100 Å, trong tế bào có các hạt ribosome và thể nhân (hình 1.10). *Mycoplasma* sinh sản theo phương thức cắt đôi. Hiện nay người ta đã biết khoảng 80 loài.

Theo hệ thống phân loại của Bergey (1994), chúng thuộc bộ Mycoplasmatales và có ba họ là Mycoplasmataceae, Acholeplasmataceae, Spiroplasmataceae.

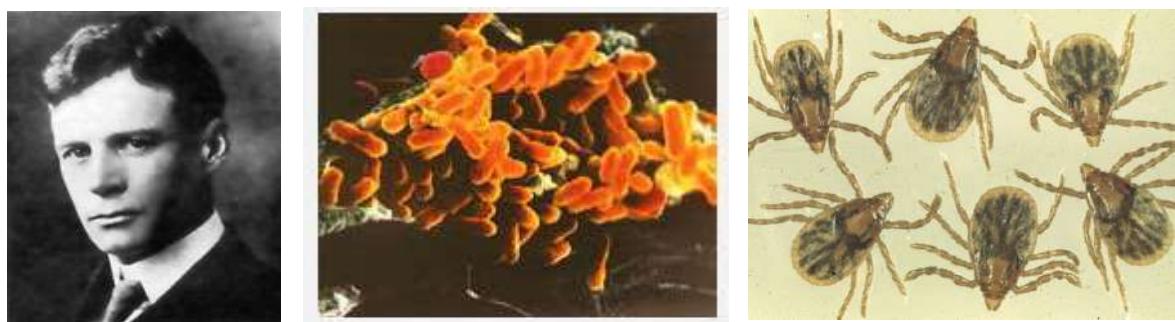


Hình 1.10. Tế bào *Mycoplasma* chụp dưới kính hiển vi điện tử (Kamran Afzan, 2010) và sơ đồ cấu tạo tế bào *Mycoplasma fermentans* (phải).

1.2.5. Rickettsia

Rickettsia được Ricketts và Wilder phát hiện năm 1910. Rickettsia có cấu trúc giống với tế bào vi khuẩn. Chúng là loài bắt buộc ký sinh trong nội bào, nên sự tồn tại của Rickettsia phụ thuộc vào sự tồn tại, phát triển và nhân lên trong tế bào chủ.

Ricketts (1909) phát hiện ra mầm bệnh của bệnh sốt thương hàn phát ban và ông đã mất năm 1910 trong khi nghiên cứu bệnh này. Vì vậy, để ghi nhớ công lao của nhà khoa học, người ta đã đặt tên ông cho nhóm vi khuẩn này là *Rickettsia* (hình 1.11).



Vi khuẩn *Rickettsia prowazekii*

Ký chủ *Dermacentor andersoni*

Hình 1.11. Howard Taylor Ricketts (1871 – 1910) (Andersson et al., 2000).

Khác với *Mycoplasma*, Rickettsia có nhân, tế bào chất và màng tế bào chất, có hai loại acid nucleic là DNA và RNA nhưng hệ thống enzyme nghèo nàn, vì vậy không phát triển được ở môi trường dinh dưỡng nhân tạo. Tế bào có kích thước khá thay đổi, loại nhỏ nhất chỉ là $0,25 \times 1,0 \mu\text{m}$, có loại có kích thước $0,6 \times 1,2 \mu\text{m}$, loại lớn nhất đạt $0,8 \times 2,0 \mu\text{m}$. Tế bào có hình thái biến hóa, có thể có hình que, hình cầu, hình song cầu, hình sợi. Trong tế bào chủ, *Rickettsia* thuộc nhóm vi khuẩn Gram âm, thường tụ tập thành từng khối dày đặc. Sinh sản bằng cách phân cắt thành hai phần bằng nhau. Dưới kính hiển vi điện tử, *Rickettsia* có thành tế bào, màng nguyên sinh chất và các thể trung tâm hình sợi gọi là chất nhân.

Rickettsia chứa khoảng 30% protein, ngoài ra còn có khá nhiều lipid trung tính, phospholipid và carbohydrate. Hàm lượng DNA chiếm khoảng 9% so với khối lượng khô của tế bào. Hàm lượng RNA thay đổi tùy theo loài nhưng thường gấp 2 – 3 lần so với DNA. *Rickettsia* có khả năng dự trữ năng lượng trong ATP và có hệ thống enzyme cytochrome nhưng không tự tổng hợp và tích lũy được amino acid cần thiết cho chúng.

Vật chủ của *Rickettsia* là các động vật chân đốt như ve, bét, bọ, rận, các động vật nhỏ bé này sẽ truyền mầm bệnh qua động vật và người như bệnh sốt phát ban, bệnh sốt hồi quy.

Theo hệ thống phân loại của Bergey (1994) thì *Rickettsia* thuộc bộ Rickettsiales, trong bộ này có 3 họ với 14 chi: họ Rickettsiaceae có 8 chi, họ Bartonellaceae có 2 chi và họ Anaplasmataceae có 4 chi.

1.2.6. Chlamydia

Chlamydia là loại vi khuẩn nhỏ bé, Gram âm, chúng vừa có một số đặc tính giống vi khuẩn vừa có đặc tính giống virus. Giống vi khuẩn vì chúng có cấu tạo tế bào, có chứa cả hai loại acid nucleic DNA và RNA, có thành tế bào chứa peptidoglycan..., nhưng lại ký sinh trong tế bào vật chủ, hay nói một cách khác chỉ nhân lên trong tế bào chủ nhân thực (điều này giống virus).

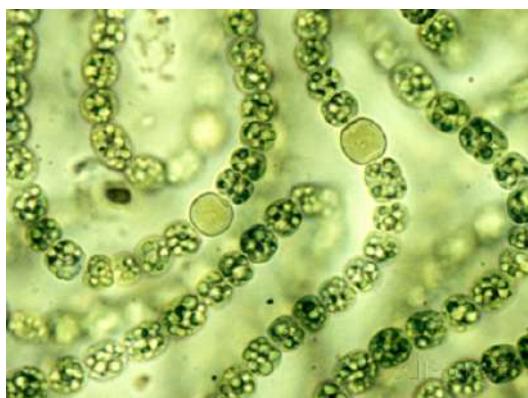
Chlamydia có cấu tạo tế bào ở hai dạng: một dạng là tế bào hình cầu có khả năng chuyển động, kích thước nhỏ ($0,15 - 0,2 \mu\text{m}$), khi nhiễm vào vật chủ, thể này tấn công và bám chắc vào mặt ngoài của tế bào chủ, loại tế bào này gọi là thể cơ bản. Thể cơ bản này xâm nhập tế bào chủ và nhờ tác dụng của thực bào ở tế bào vật chủ mà thể cơ bản này lọt vào trong tế bào, phần màng bao quanh thể cơ bản biến thành không bào, thể cơ bản dần dần lớn lên trong không bào và trở thành dạng gọi là thể lười. Thể lười này có tế bào hình cầu lớn, với màng bao bọc mỏng. Dạng hình cầu này có kích thước $0,8 - 1,5 \mu\text{m}$, ở trong tế bào vật chủ dạng này có thể phân cắt chia đôi và tạo thành nhiều tế bào vi khuẩn trong vật chủ. Đây chính là hình thức sinh sản của *Chlamydia*. Sau khi đạt đến số lượng lớn thì các tế bào này lại phân hóa thành các thể cơ bản màng dày và có tính lây nhiễm cao. Tế bào vật chủ vỡ ra sẽ giải phóng hàng loạt những thể cơ bản và rồi vi khuẩn lại gây nhiễm vào các tế bào khác.

Chlamydia khi gây bệnh đường sinh dục chúng thường gây viêm cổ tử cung, viêm hố chậu, niệu đạo, đặc biệt chủng *C. trachomatis* còn gây đau mắt ở trẻ sơ sinh, đau mắt hột, viêm kết mạc, viêm phổi người lớn và trẻ em.

Theo hệ thống phân loại của Bergey (1994) thì *Chlamydia* chỉ là một chi thuộc họ *Chlamydiaceae*, bộ *Chlamydiales*.

1.2.7. Vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*)

Vi khuẩn lam là nhóm vi sinh vật nhân sơ, có cấu tạo gần giống với cấu tạo của vi khuẩn Gram âm. Vi khuẩn lam có kích thước khoảng 1 – 30 µm (hình 1.12). Chúng có khả năng tự dưỡng quang năng nhờ chứa sắc tố quang hợp α -carotene và các sắc tố phụ. Vi khuẩn lam là thành phần của thực vật phù du sống trong nước ngọt, một số sống trong vùng nước mặn giàu chất hữu cơ. Vi khuẩn lam có khả năng cố định nitơ và đề kháng cao với điều kiện bất lợi.



Hình 1.12. Hình dạng vi khuẩn lam *Nostoc* (Ashish Dhakal – October 02, 2012) (trái); Hiện tượng nước nở hoa ở Hồ Xuân Hương – Đà Lạt (phải). Ảnh: Khắc Dũng, 2012.

Một số vi khuẩn lam sống trong ao hồ thường phát triển mạnh quá mức làm nước bị đục và tạo ra hiện tượng “nước nở hoa”. Khi đó nước có màu xanh xin và có mùi vị khó chịu, làm giảm lượng oxy trong nước, gây hại cho cá, nhiều khi ảnh hưởng tới nguồn nước cung cấp cho các đô thị, các khu công nghiệp...

1.2.8. Ý nghĩa thực tiễn của vi khuẩn

Vi khuẩn chiếm hơn 90% vi sinh vật đất, bởi vậy nó đóng vai trò quyết định trong các quá trình chuyển hóa trong đất. Vi khuẩn tham gia vào hầu hết các vòng tuần hoàn trong tự nhiên. Nhiều vi khuẩn có ích được ứng dụng vào sản xuất, chế biến nhiều sản phẩm có giá trị như mì chính, nước chấm, các loại phân bón vi sinh, thuốc trừ sâu sinh học. Ngược lại, cũng có rất nhiều loài vi khuẩn gây bệnh cho người, động thực vật như bệnh uốn ván (tetanus), sốt thương hàn (typhoid fever), giang mai (syphilis), tả (cholera), bệnh lây qua thực phẩm (foodborne illness) và lao (tuberculosis). Ở thực vật, vi khuẩn gây mụn lá (leaf spot), fireblight và héo cây... và gây hư hỏng quân trang vật dụng.

Ngày nay, với những thành tựu khoa học hiện đại, người ta đã tìm ra những biện pháp hạn chế những tác hại do vi khuẩn gây ra, ví dụ như việc dùng chất kháng sinh, vaccine phòng bệnh.

1.3. VI KHUẨN CỎ (Archaea)

Vi khuẩn cỏ (Archaea) là nhóm cơ thể nhân sơ xuất hiện sớm nhất (khoảng 4 tỷ năm trước đây), thành tế bào chứa pseudomurein, có intron và exon trong DNA được Carl R. Woese tách ra thành một nhánh tiến hóa riêng. Những cơ thể còn lại hiện nay thường sống trong các điều kiện khác thường.

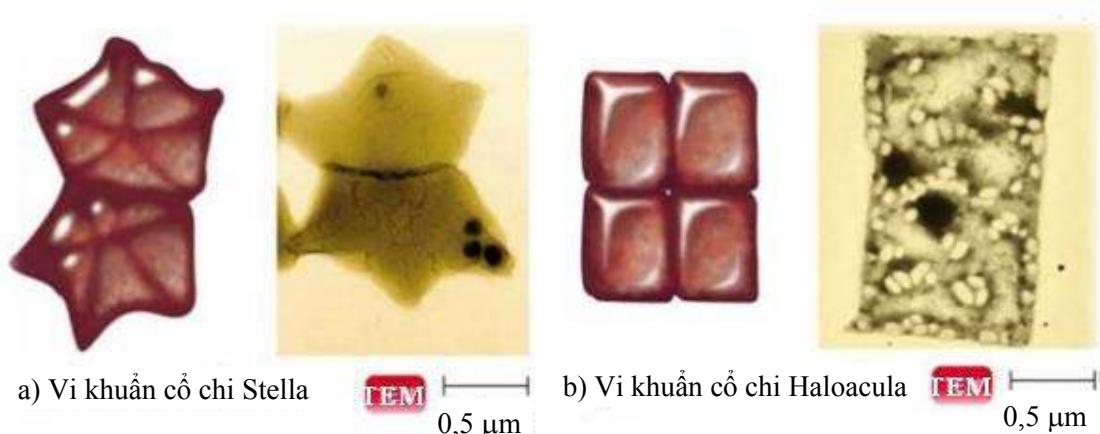
Những nghiên cứu gần đây về nhiệt độ và pH tối ưu của vi khuẩn ưa nhiệt và Archaea cho phép chia VSV cỏ thành hai nhóm: *Crenarchaeota* và *Euryarchaeota*. Nhóm *Crenarchaeota* là những VSV cỏ ký khí bắt buộc, ưa nhiệt và ưa acid (*Thermoacidophiles*, *Thermophiles anaerobies stricts*). Nhóm *Euryarchaeota* là những VSV cỏ ưa mặn, sinh methane (*methanogenes*) và một vài loài ký khí ưa nhiệt.

Có các nhóm sinh lý và sinh thái quan trọng là:

1.3.1. Các cơ thể sinh methane (methanogenes)

Đây có lẽ là nhánh cỏ xưa nhất, ở các lớp nước sâu ở đáy, ký khí, các thủy vực nước ngọt, nước lợ và nước mặn, trong đường ruột của động vật nhai lại và trong các nguồn chất thải động vật. Vi khuẩn methane có khả năng sử dụng H₂ làm nguồn năng lượng và CO₂ làm nguồn carbon để thực hiện quá trình trao đổi chất, điển hình là *Methanobacterium ivanovii*, *M. Thermoautotrophicum*... Sản phẩm của quá trình trao đổi chất là khí methane được tích tụ trong môi trường. Vi khuẩn sinh khí methane có nhiều tiềm năng được sử dụng để tạo năng lượng sinh học từ chất thải nông, công nghiệp.

1.3.2. Các cơ thể ưa mặn (halophiles)



Hình 1.13. Hình thái một vài đại diện vi khuẩn cỏ ưa mặn (Tortora et al., 1997).

Các cơ thể ưa mặn như *Haloarcula*, *Halobacterium*. Những cơ thể này sống trong môi trường có nồng độ muối cao (ở biển, ở các mỏ muối), hấp thu chất dinh dưỡng chủ yếu là do chênh lệch *gradient* nồng độ muối tạo ra, quá trình quang hợp ở đây khá đặc biệt nhờ *Bacteriorhodopsine*, hợp chất liên kết trong màng tế bào chất chứ không phải là khuẩn diệp lục (*bacteriochlorophyll*).

1.3.3. Vi khuẩn cổ ưa nhiệt cao (hyperthermophiles)

Vi khuẩn cổ ưa nhiệt cao là những sinh vật có khả năng sống ở điều kiện nhiệt độ cao hơn cả trong giới sinh vật, chúng đều có nhiệt độ sinh trưởng tối ưu trên 80 °C, nhiều loài có thể sinh trưởng ở nhiệt độ nước sôi hoặc cao hơn nữa. Ngoại trừ một vài trường hợp, đa số vi khuẩn cổ ưa nhiệt cao sinh trưởng ký khí bắt buộc và thực hiện dinh dưỡng theo phương thức hóa dưỡng hữu cơ hoặc hóa dưỡng vô cơ. Hầu hết các loài đều có nhu cầu về lưu huỳnh, hoặc làm chất nhận điện tử trong hô hấp ký khí, hay làm chất cho điện tử trong hô hấp hiếu khí. Các loài ký khí có thể sử dụng các hợp chất hữu cơ và vô cơ (như H₂) để khử lưu huỳnh S⁰ thành H₂S. Ngược lại, các loài hiếu khí oxy hóa H₂S, S⁰ thành acid sulfuric. Ngoài ra, một số loài có khả năng thực hiện hô hấp ký khí sử dụng các chất nhận điện tử khác ngoài S⁰ như nitrate (*Pyrolobus*, *Pyrobaculum*), sulfate (*Archaeoglobus*) hay sinh methane (*Methanopyrus*).

Về hình thái, vi khuẩn cổ ưa nhiệt cao tương đối đa dạng, nhiều loại có hình dạng tế bào đặc biệt. Các loài sống ở những vùng núi lửa dưới đáy đại dương với nhiều đại diện sinh trưởng ở trên 100 °C nhờ áp lực của nước biển.

1.3.4. Các cơ thể ưa nhiệt cao, ưa acid (Thermoacidophiles)

Chúng là những cơ thể sống ở nguồn đất – nước nóng, ở vùng núi lửa, chúng là những cơ thể hiếu khí hoặc hiếu ký khí.

Ví dụ: *Sulfolobus acidocaldarius* có nhiệt độ sinh trưởng tối đa là 90 °C và tối ưu là 75 °C, ở pH tối ưu là 2,5. *Thermoplasma acidophilum* có nhiệt độ sinh trưởng tối đa là 65 °C và tối ưu là 60 °C, ở pH tối ưu là 1,5.

1.3.5. Vai trò của vi khuẩn cổ

Vi khuẩn cổ là một nhóm vi sinh vật phân bố khắp mọi nơi, chúng sống ở những môi trường rất khắc nghiệt, như suối nước nóng hay hồ mặn, những nơi có pH thấp, trong các vùng sinh lầy và đặc biệt tập trung nhiều trong các đại dương. Các vi khuẩn cổ trong cộng đồng sinh vật phù du có thể là một trong những nhóm các sinh vật có số lượng đông đảo nhất trên Trái Đất. Chúng được ghi nhận như một phần quan trọng của sự sống trên hành tinh và có thể đóng vai trò ở cả chu trình carbon, chu trình nitơ và chu trình các chất khoáng. Chưa phát hiện thấy các mầm bệnh hay ký sinh là vi khuẩn cổ, chúng thường là những sinh vật hô sinh hoặc hội sinh. Nhiều loài sinh methane cư trú trong ruột người và động vật nhai lại, có số lượng lớn trợ giúp tốt cho tiêu hóa. Các vi khuẩn cổ sinh methane thường được ứng dụng trong sản xuất biogas và xử lý nước thải, các enzyme từ

các vi khuẩn cổ sống nơi khắc nghiệt, có thể chịu được độ mặn cao, nhiệt độ cao và các dung môi hữu cơ, được khai thác trong ngành công nghệ sinh học. Bên cạnh đó cũng có một số vi khuẩn cổ sinh methane là nguồn chính của methane khí quyển và là nguyên nhân làm tăng phát thải khí nhà kính, gây ra hiện tượng ấm lên toàn cầu.

Bảng 1.1. So sánh một số tính chất giữa vi khuẩn (Bacteria) và vi khuẩn cổ (Archaea)

Tính chất	Bacteria	Archaea
Thành phần thành tế bào	Murein	Pseudomurein, protein, polysaccharide
Lipid của màng	Glycerol, acid béo, ester	Glycerol, ester isopropanol
Hình dạng tế bào có loại hình vuông và dẹt	–	+ (hoặc không)
Nội bào tử (<i>endospore</i>)	+ (hoặc không)	–
Chất "ở nhánh" của RNA _t	Ribothymidin	Pseudouridine hoặc L-methylpseudouridine
Hình thành chất kích thích <i>methionyl RNA_t</i>	+	–
Các <i>intron</i> trong gen	–	+
Có Polymerase – RNA loại nhân thực	–	+
Có coenzyme đặc biệt	–	+
Nhiệt độ sinh trưởng tối đa	90 °C	110 °C hoặc hơn
Có quang hợp phức tạp	Có thể	–
Có thể sinh methane	–	+
Chu trình Calvin được sử dụng khi cố định CO ₂	Có thể	–

TÓM TẮT CHƯƠNG

Vi sinh vật nhân sơ là các sinh vật có cấu trúc đơn giản nhất, nhân chưa có màng (thường gọi là thể nhân – nucleoid) chưa có ty thể, lưới nội chất và bộ máy Golgi. Sinh vật nhân sơ bao gồm vi khuẩn và vi khuẩn cổ (*Archaea*). Đặc tính cấu trúc của sinh vật nhân sơ được tóm tắt ở (bảng 1.2).

Vi khuẩn thật (*Bacteria*) là một nhóm sinh vật đơn bào, có kích thước nhỏ, nhân chưa có màng, 1 NST tròn, chưa có hiện tượng xoang hóa, sinh sản chủ yếu theo hình thức phân đôi. Chúng thường có thành tế bào với thành phần cấu tạo là murein (peptidoglycan).

Xạ khuẩn (*Actinomycetes*) là tên chung để chỉ nhóm VSV đơn bào có hình sợi phân nhánh như nấm nhưng kích thước và cấu trúc giống với vi khuẩn Gram dương, có vai trò quan trọng trong nuôi trồng thủy sản, trong y học, thú y học, trong bảo vệ thực vật.

Vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*) có chứa sắc tố quang hợp tilacoid, nên có khả năng quang hợp. Chúng có giá trị dinh dưỡng cao, chứa nhiều protein, amino acid, vitamin và nhiều yếu tố sinh trưởng khác. Chúng có ý nghĩa quan trọng trong quá trình hình thành và cải tạo đất, là nguồn thức ăn tốt cho thủy sản.

Các vi khuẩn cổ (*Archaea*), mà trước đây gọi là *Archaeabacteria*, là nhóm cơ thể nhân sơ xuất hiện sớm nhất (khoảng 3,5 – 4 tỷ năm trước đây), thành tế bào chứa pseudomurein, có intron và exon trong DNA. Vi khuẩn cổ là một nhóm VSV đa dạng, không những về hình thái và sinh lý, mà còn về môi trường sống, cung cấp nguồn gene quý và có vai trò rất quan trọng trong hệ sinh thái trên Trái Đất mà hiện nay con người còn chưa hiểu rõ được.

Bảng 1.2. Cấu trúc và chức năng tế bào sinh vật nhân sơ

Vị trí	Cấu trúc	Chức năng
Tế bào chất	Nhiễm sắc thể	<ul style="list-style-type: none">– Không có màng, chứa thông tin di truyền và quá trình nhân đôi (DNA).
	Plasmid	<ul style="list-style-type: none">– DNA ngoài nhiễm sắc thể cung cấp các lợi thế cạnh tranh cho tế bào như kháng sinh...
	Ribosome	<ul style="list-style-type: none">– Tổng hợp protein (rRNA và protein).
Vỏ bọc tế bào	Màng tế bào	<ul style="list-style-type: none">– Màng thấm chọn lọc có ở các loại vi khuẩn cho phép hấp thụ và đào thải chất dinh dưỡng, độc tố và các sản phẩm đào thải của tế bào, được cấu trúc bởi 2 lớp phospholipid và protein tạo thành các khe trao đổi ion, bơm proton và các thụ thể.

	<p>Thành tế bào</p> <p>Khoang chu chất (periplasmic space)</p> <p>Màng ngoài</p> <p>Lipopolysaccharide (LPS)</p> <p>Teichoic acid</p> <p>Lớp S</p>	<ul style="list-style-type: none"> Cứng, cấu trúc bán thấm nhằm tạo hình và bảo vệ tế bào. Chứa các chất dinh dưỡng đạt được, vận chuyển điện tử, biến đổi các độc chất đối với tế bào. Màng bán thấm thứ hai chỉ được tìm thấy ở các tế bào Gram âm. Lớp ngoài cùng chứa các phân tử lipopolysaccharide (LPS) – nội độc tố. Nằm ở lớp ngoài của màng ngoài tế bào Gram âm. Các phân tử mang điện tích âm giúp tế bào tương tác gián tiếp với môi trường. Các phân tử này là nội độc tố và kháng nguyên. Nằm chèn vào thành peptidoglycan của các tế bào Gram dương. Các phân tử mang điện tích âm giúp tế bào tương tác gián tiếp với môi trường, bám dính... Acid teichoic là kháng nguyên. Lớp protein đơn phân ở bề ngoài của tế bào, bảo vệ tế bào chống lại các thể ăn khuẩn (phage), đóng vai trò bảo vệ sự xâm nhập của các đại phân tử, giúp ổn định tế bào và cũng có vai trò điểm bám dính cho các protein bên ngoài. Lớp S kết hợp với LPS ở vi khuẩn Gram âm, với peptidoglycan ở vi khuẩn Gram dương, với Pseudomurein hay Methanochondroitin ở Archaea.
Mặt ngoài tế bào	Glycocalyx	<ul style="list-style-type: none"> Một lớp hỗn hợp polysaccharide, protein và DNA ngoài bao bọc bên ngoài màng tế bào, bảo vệ tế bào khỏi bị thực bào và khô. Một lớp khuếch tán không đều có vai trò như lớp chất nhờn và một lớp phân biệt khác như là giáp mạc.
Phần phụ	<p>Roi</p> <p>Tiêm mao hay vi nhung</p>	<ul style="list-style-type: none"> Phần phụ dài ra giúp cho việc di chuyển của tế bào. Cấu trúc protein mảnh và rỗng giúp cho việc bám dính giữa các tế bào cũng như các bề mặt.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Các loại vi sinh vật nhân sơ? Vi khuẩn phân bố ở đâu?
2. Đặc điểm của các loại vi sinh vật nhân sơ?
3. Vai trò của các loại vi sinh vật nhân sơ?
4. Xạ khuẩn giống và khác nấm sợi ở những đặc điểm nào?
5. Khuẩn lạc của xạ khuẩn giống và khác với khuẩn lạc nấm sợi ở những đặc điểm nào?
6. Vai trò của vi khuẩn cổ? Archaea khác với Bacteria ở những đặc điểm nào?
** Chọn đáp án đúng nhất*
7. Đặc điểm chung của vi khuẩn và xạ khuẩn là:
 - (1). Chưa có nhân phân hóa;
 - (2). Chưa có bào quan có màng bao;
 - (3). Thành tế bào chứa peptidoglycan;
 - (4). Chưa có sinh sản hữu tính;
 - (5). Ribosome 70S.
 - a. 1 – 2 – 3 – 4; b. 2 – 3 – 4 – 5; c. 1 – 2 – 3 – 5; d. 1 – 2 – 4 – 5;
 - e. Tất cả các ý trên.
8. Peptidoglycan gặp ở thành (vách) tế bào vi khuẩn chứa tất cả các phân tử sau đây, trừ:
 - a. NAM; b. Các tetrapeptide; c. NAG; d. Các phospholipid.
9. Mục đích nào sau đây của thành tế bào vi khuẩn là mục đích chủ yếu?
 - a. Nó cho phép tế bào di động;
 - b. Nó giúp tế bào thu nhận chất dinh dưỡng.
 - c. Nó tạo cho tế bào một hình dạng đặc thù;
 - d. Nó bảo vệ tế bào khỏi lực thấm thấu.
10. So sánh một số tính chất giữa vi khuẩn và vi khuẩn cổ

Đặc điểm so sánh	Bacteria	Archaea
a. Tế bào có dạng hình vuông hoặc hình sao		
b. Không hình thành nội bào tử		
c. Không có intron trong gene (hệ gene không phân mảnh, gene liên tục)		
d. Nhiều loài sinh methane và dinh dưỡng methane		
e. Sống trong điều kiện sinh thái đặc biệt		
f. Lipid màng có glycerol, acid béo mạch thẳng và liên kết ester		
g. Có thymine trong tRNA		

* Diền vào các chỗ trống

11. Sự khác biệt cơ bản giữa tế bào Prokaryote với tế bào Eukaryote là ở chỗ:
 - a. Nguyên liệu di truyền của chúng..... không được bao bọc bởi.....
 - b. Thiếu các bào quan như:.....được bao bọc bởi màng.
 - c. Thành tế bào luôn luôn chứa phức hệ.....hay còn gọi là.....
 - d. Ribosome của các tế bào prokaryote thuộc loại.....
12. Nội bào tử là thể.....(a)..... của các tế bào vi khuẩn, không phải là phương tiện sinh sản, khi gặp điều kiện thuận lợi, bào tử sẽ nảy mầm và mỗi bào tử chỉ cho....(b)....tế bào sinh dưỡng.

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. **Angstrom (Å):** Đơn vị đo chiều dài tương ứng 10^{-10} m.
2. **Archaea:** Vi khuẩn cổ, trước đây dùng là Archaebacteria.
3. **Bào tử đính (Conidiospore):** Bào tử vô tính được sinh ra từ đầu của cuống bào tử.
4. **Bộ gen của vi khuẩn:** là một phân tử DNA dạng vòng gấp khúc và tự xoắn nặm trong tế bào chất (còn gọi là nhiễm sắc thể vi khuẩn hay nucleoid). Chiều dài 1 mm nhưng gấp khúc để nặm trong tế bào có đường kính 2 – 3 µm. Không gian chật hẹp còn buộc DNA tạo nên cấu trúc siêu xoắn (supercoil). DNA được chuyển đổi trong quần thể nhòe: tiếp hợp, tái nạp và biến nạp.
5. **Cuống bào tử (Conidiophore):** Sợi khí sinh mang các đính bào tử.
6. **Intron:** là những đoạn DNA bên trong một gene nhưng không tham gia vào việc mã hóa protein. Chúng thường xuất hiện trong các sinh vật eukaryote và không được tìm thấy trong các sinh vật prokaryote (đôi lúc được tìm thấy trong các loài vi khuẩn cổ).
7. **Khuẩn lạc (Colony):** Một dòng tế bào được sinh ra trên môi trường đặc nhòe sinh sản vô tính phân đôi từ tế bào ban đầu, có thể nhìn thấy khuẩn lạc bằng mắt thường.
8. **Nội bào tử (endospore)** là dạng nghỉ của tế bào khi gặp điều kiện không thích nghi. Nội bào tử có lớp vỏ dày và chứa Calcium dipicolinate ($C_{12}H_8CaN_2O_4$).
9. **Nucleoid:** Thể nhân, nhân sơ chưa có màng nhân bao bọc.
10. **Plasmids:** (thường) là các phân tử DNA mảnh đôi dạng vòng nặm ngoài DNA nhiễm sắc thể chứa thông tin cho một đặc điểm nào đó, ví dụ tính kháng thuốc. Chúng thường hiện diện trong vi khuẩn, đôi khi cũng có ở sinh vật có nhân thực (eukaryote) (ví dụ như vòng 2 micrometre ở *S. cerevisiae*). Chúng có kích thước khoảng từ 1 đến hơn 400 kilobase pairs (kbp). Chúng có thể hiện diện chỉ một bản sao, đối với plasmid lớn, cho tới vài trăm bản sao trong cùng một tế bào.
11. **Xạ khuẩn (Actinomycetes):** Vi khuẩn Gram dương, trong chu trình sống hình thành hệ sợi phân nhánh không vách ngăn, đầu cuống bào tử có thể hình thành bào tử riêng lẻ hoặc chuỗi. Các xạ khuẩn hình thành bộ xạ khuẩn (*Actinomycetales, Bergay's Manual, 1989*).

Chương 2

VI SINH VẬT NHÂN THỰC

Mục tiêu

- *Nấm được đặc điểm đặc trưng của các nhóm vi sinh vật nhân thực.*
- *Hiểu được chức năng của các nhóm vi sinh vật nhân thực.*
- *Vận dụng những hiểu biết về đặc điểm của vi sinh vật nhân thực để ứng dụng trong xử lý chất thải, nước thải cải tạo và bảo vệ môi trường.*

Vi sinh vật nhân thực bao gồm các vi sinh vật nhân có màng nhân, tế bào có hiện tượng xoang hóa, có các bào quan có màng bao quanh như ti thể, lưới nội chất, bộ máy Golgi. Các nhóm vi sinh vật có nhân thật bao gồm vi nấm (nấm men, nấm sợi), vi tảo và một số nguyên sinh động vật.

2.1. VI NẤM (Microfungi) VÀ NẤM MŨ (Crimini)

Vi nấm gồm nấm nem và nấm sợi (hay nấm mốc) là những sinh vật nhân thực có thành tế bào bằng chitin. Phần lớn vi nấm phát triển dưới dạng các sợi đa bào được gọi là sợi nấm (hyphae) tạo nên hệ sợi (mycelium), một số vi nấm khác lại phát triển dưới dạng đơn bào, phần lớn, không có lục lạp, không có lông và roi. Sống dị dưỡng hoại sinh, ký sinh, hay cộng sinh. Sinh sản chủ yếu bằng bào tử.

Nấm mũ là các loài nấm thuộc ngành Basidiomycota và Agaricomycetes.

Các cơ thể nấm với cấu tạo thành tế bào, kiểu trao đổi chất và hệ enzyme khác biệt với các cơ thể nhân thực khác (thực vật, động vật) và khác xa với cơ thể nhân sơ nên từ lâu đã được xếp thành một giới riêng – đó là giới nấm (*Regnum fungi*).

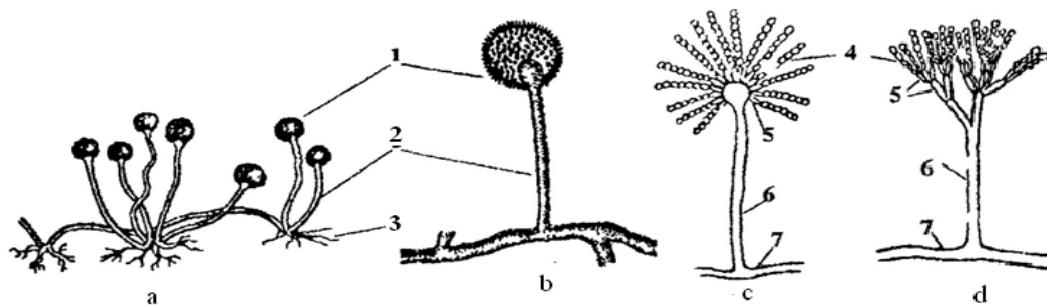
Có bốn đặc tính khác biệt giữa nấm và thực vật:

- + Nấm thiếu chlorophyll, trong khi thực vật có chứa chlorophyll.
- + Thành tế bào nấm chứa carbohydrate được gọi là chitin, thành tế bào thực vật chứa cellulose.
- + Phần lớn nấm không có dạng đa tế bào thực như ở thực vật.
- + Nấm là loài dị dưỡng, thực vật tự dưỡng.

Theo phương pháp truyền thống, định danh loài nấm thường dựa vào hình thái, cấu trúc bào tử và cấu tạo màng acid béo. Có khoảng 75 000 loài được miêu tả trong số 1,5 triệu loài nấm có thể tồn tại. Tuy nhiên, với việc sử dụng phương pháp giải trình tự DNA hiện đại (High-throughput sequencing) thì số lượng loài có đến 5,1 triệu loài.

Dựa vào đặc điểm hình thái, vi nấm được phân thành hai nhóm chính: nấm men (Levures, Yeasts) và nấm sợi (Moisissures).

Trong đất, vi nấm có vai trò quan trọng trong việc phân hủy các chất hữu cơ thành các chất dinh dưỡng cho thực vật, cấu trúc nên lớp mùn màu mỡ của đất, tham gia vào sự chuyển hoá các chất vô cơ trong đất. Một số loài nấm có khả năng lên men thực phẩm như lên men rượu (*Saccharomyces cerevisiae*), một số có khả năng sinh chất kháng sinh (*Penicillium* sp.), enzyme, các acid hữu cơ và nhiều chất khác.



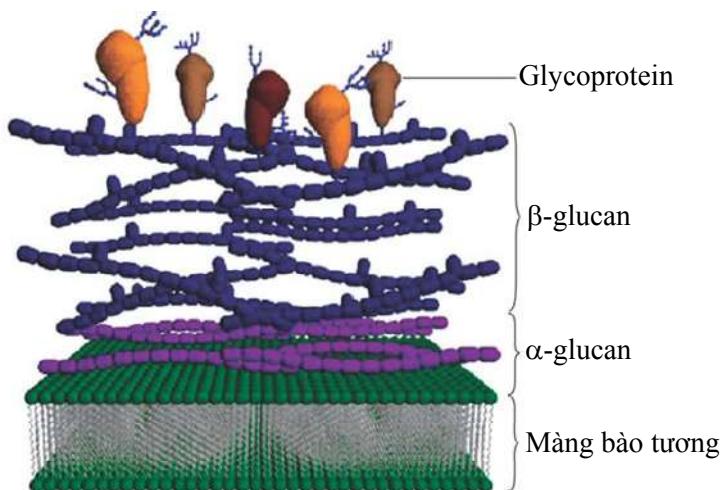
Hình 2.1. Một số chi vi nấm (M.H. Сениюкова, 2015).

a – *Rhizopus*; b – *Mucor*; c – *Aspergillus*; d – *Penicillium*.

1 – Túi bào tử; 2 – Cuống bào tử; 3 – Rễ giã;

4 – Bào tử đính; 5 – Thể binh; 6 – Cuống sinh bào tử đính; 7 – Sợi bò lan.

Màng nấm và thành tế bào nấm là cấu trúc phức tạp có vai trò thẩm thấu chọn lọc và bảo vệ. Như sinh vật nhân thực, nấm có màng bao quanh các bào quan và được cấu tạo bởi hai lớp phospholipid bên ngoài và lớp protein chèn ở giữa. Thêm vào lớp phospholipid, màng nấm còn chứa sterol, glycolipid và sphingolipid, có thể dùng làm khóa để phân loại nấm. Thành tế bào nấm là cấu trúc nhiều lớp bao gồm chitin, N-acetylglucosamine gốc đường, cellulose, galactosan, chitosan và mannan. Một số thành tế bào còn chứa protein và lipid (Xem hình màu 2.2 trang 361).



Hình 2.2. Cấu trúc thành tế bào nấm (Pepper et al., 2015).

Vi nấm không có một chu trình phát triển chung. Tùy loài mà có một trong năm kiểu chu trình phát triển: (1) chu trình lưỡng bội; (2) chu trình hai thế hệ; (3) chu trình đơn bội; (4) chu trình đơn bội – song nhân và (5) chu trình vô tính.

Vi nấm có nguồn gốc chưa rõ ràng và có nhiều ý kiến khác nhau, các ngành, thậm chí các lớp trong một ngành đã bắt nguồn từ các tổ tiên khác nhau. Người ta cho rằng nấm cổ có tổ tiên từ trùng roi nào đó. Các dạng nấm hiện nay đã xuất hiện rất lâu. Các bào tử của chúng rất giống với bào tử của những loài nấm trong lớp đất của các kỷ xa xưa. Trong đất thuộc Mezozoi (cách đây 70 – 185 triệu năm) tìm thấy di tích của nấm rất giống với nấm thuộc bộ Mốc, nước của nấm noãn và nấm túi chưa hoàn chỉnh thuộc chi *Diplodia*...

Vi nấm là những loài sinh vật hóa dị dưỡng, phân giải đường đơn tạo thành carbon và năng lượng, tuy nhiên, nguồn đường đơn giản trong môi trường hạn chế. Vì vậy, nhiều loại nấm tiết ra enzyme ngoại bào để phân hủy các đại phân tử phức tạp thành các hợp chất carbon đơn giản cho tế bào sử dụng. Nấm đóng vai trò quan trọng trong việc phân hủy và tuần hoàn xác thực vật, côn trùng và động vật, đặc biệt là các đại phân tử cấu thành nên chúng như cellulose và lignin ở thực vật, chitin ở côn trùng. Nhờ khả năng phân hủy các đại phân tử, các chất thải trong môi trường được phân hủy và tuần hoàn. Loài nấm men *Aureobasidium pullulans* có khả năng phân hủy nhựa PVC. Sợi nấm *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Allescheriella* và *Phlebia* có khả năng phân hủy các hydrocarbon thơm trong sản phẩm dầu mỏ và thuốc trừ sâu.

Nấm Mycorrhizae hay nấm vùng rễ (khuẩn căn) sống cộng sinh ở nhiều thực vật làm tăng bè mặt hấp thụ của rễ lên hàng trăm đến hàng nghìn lần, giúp cho rễ cây tăng khả năng hấp thụ nước và chất dinh dưỡng, đặc biệt phosphate. Ngược lại, rễ cây cung cấp đường từ quá trình quang hợp cho nấm. Một số loài nấm sống cộng sinh ở thực vật có khả năng tạo ra hợp chất hữu cơ có thể tiêu diệt được các mầm bệnh ở thực vật như: *Pythium ultimum* và ở người như: *Mycobacterium tuberculosis* và *Staphylococcus aureus*.

2.1.1. Nấm men (Yeast, Levures)

2.1.1.1. Đặc điểm hình thái, cấu trúc và sinh sản của nấm men

Nấm men là tên gọi thông dụng để chỉ một nhóm vi nấm cơ thể đơn bào, nhân có màng, sinh sản chủ yếu theo kiểu này chồi. Nấm men không phải là một nhóm nấm riêng biệt mà thuộc nhiều nhóm khác nhau trong giới nấm. Nấm men có thể thuộc về ba lớp nấm là nấm túi (*Ascomycetes*), nấm đầm (*Basidiomycetes*) và nấm bất toàn (*Deuteromycetes*).

Tế bào nấm men có nhiều hình dạng khác nhau, có thể hình cầu, hình bầu dục, hình elip, hình ống. Kích thước tế bào thay đổi từ 1,5 – 12 µm. Nếu tế bào dạng sợi thì chiều dài có thể tới 20 µm hay hơn nữa, thường là sợi nấm giả gồm nhiều tế bào dính lại với nhau theo chiều dài một cách lồng léo.

Trong số 75.000 loài nấm hiện đã biết có hơn 500 loài nấm men thuộc khoảng 50 giống.

Thành tế bào nấm men thường dày khoảng 100 – 250 nm, cấu tạo chủ yếu bằng hợp chất mannan – glucan hay mannan – chitosan. Bên dưới thành tế bào là màng sinh chất có cấu tạo không khác gì mấy so với ở tế bào sinh vật khác.

Màng tế bào chất nấm men thường chứa 39% lipid, 49% protein, 5% carbohydrate và 7% nucleic acid.

Khác với vi khuẩn, nấm men đã có nhân phân hóa, nhân có màng nhân, lỗ thủng và nhân con. Trong tế bào nấm men có các cơ quan nhỏ như ti thể, lưới nội chất, bộ máy Golgi...

Ti thể nấm men có dạng hình cầu, hình bầu dục hay hình sợi được bao bởi hai lớp màng, giữa hai lớp màng là cơ chất bán lỏng. Từ lớp màng trong lại tạo ra vô số những vách nối vào phía trong gọi là vách ngang để tăng diện tích bề mặt của màng. Ti thể là trung tâm tạo năng lượng của tế bào. Trong ti thể còn gấp cả một lượng nhỏ DNA, gọi là DNA của ti thể.

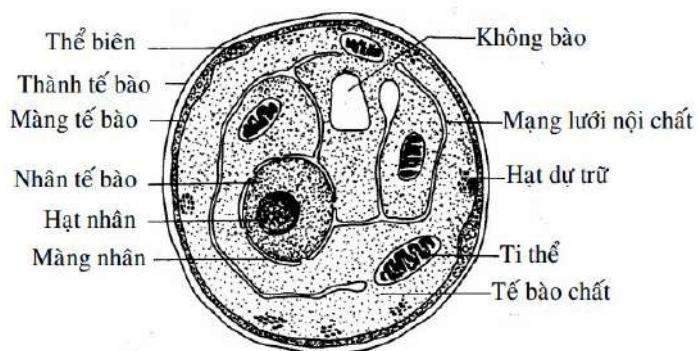
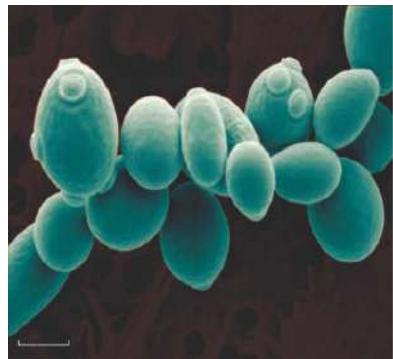
Bộ máy Golgi gồm những túi, những không bào cấu tạo bởi các lớp màng xếp song song hình cung. Bộ máy Golgi tham gia vào hoạt động bài tiết các chất cặn bã, các chất độc hại ra khỏi tế bào.

Lưới nội chất là hệ thống các ống, các xoang phân nhánh với cấu trúc màng tương tự như màng sinh chất. Trên màng lưới nội chất có rất nhiều ribosome, cơ quan tổng hợp protein của tế bào. Nấm men sinh sản vô tính bằng đâm chồi hoặc phân chồi, giữa quá trình này có thể sinh sản hữu tính.

Nấm men có ba dạng chu trình sinh học:

- Chu trình đơn bội – lưỡng bội như loài *Saccharomyces cerevisiae*.
- Chu trình ưu thế lưỡng bội như loài *Saccharomyces ludgizii*.
- Chu trình ưu thế đơn bội như ở loài *Schizosaccharomyces octosporus*.

Nhờ kính hiển vi điện tử, các nhà nghiên cứu đã thấy có sự khác nhau về thời gian hình thành thoi vô sắc trong sinh sản vô tính ở nấm men phân đôi và nấm men nảy chồi.



Hình 2.3. Nảy chồi (trái) và cấu trúc của tế bào nấm men (phải).

2.1.1.2. Đặc điểm của nấm men loài *Saccharomyces cerevisiae*

Tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* có dạng hình cầu hay hình trứng, có kích thước nhỏ, từ 5 – 6 đến 10 – 14 µm, sinh sản bằng cách tạo chồi và tạo bào tử.

Nguồn dinh dưỡng chủ yếu của chúng là sử dụng đường glucose, galactose, saccharose, maltose như nguồn carbon, chúng sử dụng amino acid và muối ammonium như nguồn nitơ.

Sinh sản hữu tính bằng cách hình thành nang bào tử. Nang bào tử có 4 – 8 bào tử.

Khi nuôi cấy trong môi trường lỏng, nấm men phát triển bằng cách tạo cặn lắng ở đáy.

Có khả năng lên men đường saccharose, glucose, fructose, maltose, không lên men lactose.

2.1.1.3. Vai trò sinh học của nấm men

Nấm men có giá trị dinh dưỡng cao vì giàu protein (45 – 55% khối lượng khô) và vitamin (tiền vitamin D và các loại vitamin nhóm B). Nấm men lại có tốc độ phát triển nhanh, có thể đồng hóa trực tiếp muối vô cơ (N, P, K) và hầu như các hợp chất carbon hữu cơ đều có thể (trực tiếp hoặc gián tiếp) dùng làm thức ăn nuôi cấy nấm men (rỉ đường, farafin, dầu mỏ...).

Bảng 2.1. Bảng phân nhánh đơn giản các nấm men

Lớp (Classes)	Bộ	Họ	Họ phụ	Chi
Nấm tüi (Ascomycetes)	Endomycetaceae	Saccharomycetaceae	Schizosaccharum – vcetoideae Nadsonioideae Lipomycetoideae Saccharomycetoideae	<i>Schizosaccharomyces</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Lipomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Hansenula</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Sacharomyces</i> <i>Coccidiascus</i>
Nấm đầm (Basidiomycetes)	Ustilaginales- Tremellales	Filobasidiaceae Leuvures Sirobasidiaceae Tremellaceae		<i>Filobasidium</i> <i>Leucosporidium</i> <i>Sirobasidium</i> <i>Tremalla</i>
Nấm bất toàn (Deuteromycetes)	Blastomycetales	Cryptococcaceae Sporobolomycetaceae	Cryptococcoideae Rhodotoruloideae Trichospororoideae	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Torulopsis</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Trichosporon</i> <i>Sporobolomyces</i>

Nấm men chiếm một vị trí đặc biệt trong công nghiệp thực phẩm: làm nở bột mì, nấu rượu, làm rượu vang, làm phomat, sản xuất sinh khối để tinh chế protein. Riêng sản xuất bánh mì, hằng năm thế giới đã tiêu thụ 1,7 triệu tấn nấm men bánh mì.

Một số nấm men khác là nguyên nhân gây hư hỏng thực phẩm. Trong số này có những loài nấm men có thể phát triển được cả trong môi trường có nồng độ đường rất cao, chúng làm hỏng mứt hoa quả, mật ong, siro, một số khác gây bệnh ở người, động vật và cây trồng.

2.1.2. Nấm sợi (Molds)

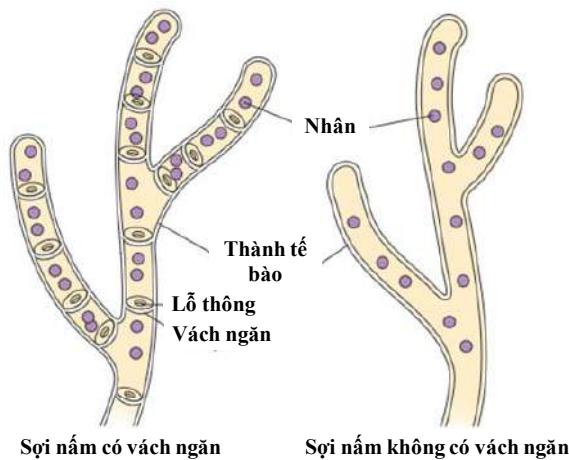
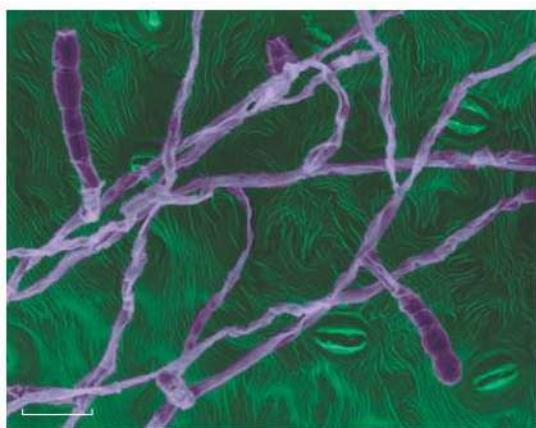
Nấm sợi (hay còn gọi là nấm móc) là tên để chỉ các nhóm nấm không phải là nấm men, cũng không phải là nấm lớn có quả thể (nấm mũ).

2.1.2.1. Cấu tạo của nấm sợi

Nấm sợi thường tạo thành những khối sợi có nhánh gọi là khuẩn ti hay sợi nấm. Sợi nấm là một ống hình trụ dài, thường phân nhánh, có loại có vách ngăn ngang như các lớp nấm bậc cao (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*) hoặc không vách ngăn thuộc về các nấm bậc thấp như *Oomycetes* và *Zygomycetes*.

Một số loại nấm sợi thường dùng trong thực phẩm như *Mucor*, *Rhizopus*..., sợi nấm thường không có vách ngăn. Toàn bộ hệ sợi có thể coi là một tế bào phân nhánh, người ta gọi đây là cơ thể đa nhân. Phần lớn sợi nấm có vách ngăn tạo nên cơ thể đa bào.

Đường kính sợi nấm vào khoảng 0,3 – 5 µm, cũng có khi đạt tới 10 µm hay lớn hơn (mắt thường có thể nhìn thấy). Trên cơ chất tự nhiên hoặc trên môi trường nuôi cấy đặc (thạch đĩa, thạch nghiêng...), sợi nấm phát triển thành một hệ sợi (khuẩn ti thể) có dạng hình tròn và được gọi là khuẩn lạc nấm sợi.



Hình 2.4. Hình dạng sợi nấm có vách ngăn và không có vách ngăn (Jeffrey et al., 2011).

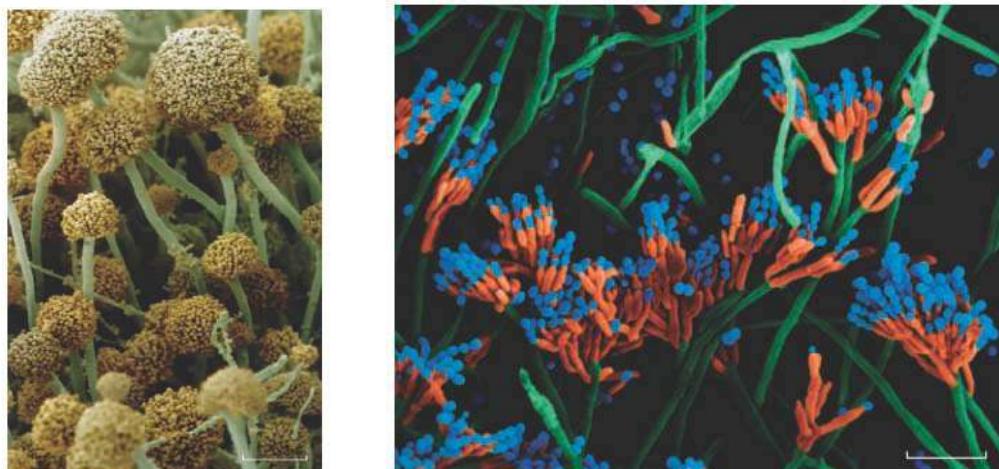
Nấm sợi chỉ tăng trưởng ngọn. Điều đáng chú ý là các vách ngăn không ngăn ngang (ở các nấm có vách ngăn) không làm cho sợi nấm có cấu tạo đa bào hoàn chỉnh, vì các vách ngăn này đều có lỗ thông (một hay nhiều lỗ). Qua các lỗ thông này, sinh chất có thể qua lại dễ dàng mà ngay cả nhân cũng có thể thótt nhỏ lại để chui qua. Kết quả là có những tế bào có nhiều nhân (thường ở phần ngọn) và ngược lại cũng có những tế bào không có nhân. Ngoài ra trong hệ sợi nấm, khi có hai đầu sợi nấm tiếp cận sát với nhau, thì thành ở chỗ tiếp cận này có thể hóa nhầy, kết quả là hai sợi liên thông với nhau (hình 2.4). Chính vì vậy, có thể nói cả hệ sợi nấm là một ống thông suốt và chất dinh dưỡng cũng như chất nguyên sinh có thể lưu chuyển dễ dàng trong ống đó.

Thành tế bào nấm sợi có cấu trúc khác nhau tùy từng nhóm, đa số chứa chitin, glucan, chitosan... Tế bào nấm sợi có chứa các thành phần tương tự như ở tế bào nấm men: nhân, ti thể, bộ máy Golgi, lưới nội chất...

2.1.2.2. Đời sống của nấm sợi

Nấm sợi không chứa sắc tố quang hợp, vì vậy chúng chỉ có thể có đời sống hoại sinh (trên chất hữu cơ chết), ký sinh (trên cơ thể người, động vật, thực vật) hoặc cộng sinh (với tảo trong địa y, với rễ cây trong nấm rễ).

Nấm sợi sinh sôi này nở bằng cách đứt đoạn sợi nấm, vừa bằng cách tạo ra rất nhiều bào tử vô tính hay hữu tính (xem hình màu 2.5 trang 361).



Hình 2.5. Hình ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét màu sợi nấm mang bào tử.
(A) – Nấm mốc *Rhizopus*; (B) – *Penicillium roquefortii* (Jeffrey et al., 2011).

Bào tử vô tính như: Bào tử kín, bào tử màng dày, bào tử tràn, bào tử đốt, bào tử phán....

Bào tử hữu tính (tạo thành sau quá trình sinh sản hữu tính) như: bào tử noãn, bào tử tiếp hợp, bào tử đâm.

Một số nấm có thể sinh ra các động bào tử một roi (*chytridiomycetes*) hoặc hai roi (*Oomycetes*) trong chu trình sinh sản của mình. Các nấm bậc cao như loài *Aspergillus* và *Penicillium* có thể hình thành cầu tiếp hợp giữa hai tế bào của hai sợi (+ và -), đó là hiện tượng sinh sản cận tính (hình 2.6).



Hình 2.6. Nấm *Rhizopus* (trái) bào tử tiếp hợp ở *Rhizopus* hai sợi (+) và (-) (phải).

2.1.2.3. Vai trò của nấm sợi

Nấm mốc phân bố rộng rãi trong tự nhiên như đất, nước, không khí nguyên vật liệu, lương thực, thực phẩm. Chúng đóng vai trò quan trọng trong việc khép kín các vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên, chúng có khả năng phân giải mạnh mẽ các chất hữu cơ phức tạp.

Có một số loại nấm thường có trong bùn như *Geotrichum*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, và *Alternaria*, chúng chỉ sống ở điều kiện độ pH thấp, độc chất, chất thải thiếu nitơ. Trong bùn người ta thấy có rất nhiều *Geotrichum* khi ở điều kiện độ pH thấp trong nước thải acid.

Hầu hết nấm sợi có đời sống dị dưỡng. Một số sống cộng sinh với thực vật, khi cộng sinh với tảo đơn bào hoặc tập hợp đơn bào thì hình thành địa y (Lichens).

Nấm sợi đã được ứng dụng trong nhiều ngành kinh tế quốc dân. Trong công nghiệp dược phẩm, nấm sợi được sử dụng để sản xuất các thuốc kháng sinh như penicillin, cephalosporin, nhiều loại vitamin như B₂... Trong công nghiệp hóa chất và công nghiệp thực phẩm, nấm sợi được sử dụng để sản xuất formage, citric acid, nucleic acid, gibberellin, indoleacetic acid.

Nhiều nấm sợi được ứng dụng trong quá trình chuyển hóa các hợp chất steroid và alkaloid (dùng để làm thuốc). Nhiều loài nấm sợi là sinh khối rẻ tiền và có thể sản xuất dễ dàng ở quy mô công nghiệp tạo ra nguồn thức ăn bổ sung giàu protein và vitamin cho người, cho gia súc, gia cầm.

Nấm sợi thường có những enzyme phân giải rất mạnh như hệ enzyme phân giải cellulose, phân giải pectin, các enzyme amylase, protease, lipase... Từ xa xưa, nhiều loài

nấm sợi đã được nhân dân ta sử dụng để sản xuất tương, chao, nước chấm, tạo các enzyme...

Tuy nhiên, có rất nhiều loài nấm sợi ký sinh gây nên nhiều bệnh khó chữa ở người và gia súc, nhiều loại nấm gây tổn thất lớn cho cây trồng và cây rừng. Các bệnh nấm ở người như hắc lào, lang ben, nấm tóc... ở lúa như đạo ôn, đốm nâu, mốc sương, khô vằn...

Phân loại nấm sợi chủ yếu dựa vào các tính trạng hình thái: cấu tạo sợi mang bào tử, cấu tạo bào tử và một số tính trạng sinh lý sinh hóa.

Bảng 2.2. Bảng phân loại đơn giản một số giống nấm sợi

<i>Ngành</i>	<i>Ngành phụ</i>	<i>Lớp</i>	<i>Bộ</i>	<i>Chi</i>
Amastigomycota	Zygomycotina (Zygomycetes)	Zygomycetes	Mucorales	<i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i>
	Ascomycotina	Plectomycetes	Eurotiales	<i>Emericella</i> (<i>A. nidulans</i>)
		Pyrenomycetes	Spahaeriales	<i>Neurospora</i> (<i>N. grassei</i>)
		Hemiascomycetes	Endomycetales	<i>Eremothecium</i>
Basidiomycota	Basidiomycotina (Basidiomycetes)	Hemibasidiomycetes	Urenidales Ustilaginales	<i>Puccinia</i> <i>Ustilago</i> <i>Candida</i> <i>Geotrichum</i>
	Deuteromycotina (Deuteromycetes)	Hyphomycetes (dạng nấm men = Blastomycetes) Hyphomycetes	Moniliales	<i>Aspergillus</i> (<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i>) <i>Penicillium</i> <i>P. votatum</i> , <i>P. camenbertii</i> , <i>P. roquefortii</i>)

2.1.3. Nấm mủ (Crimini)

Nấm mủ hay nấm quả thể thường để chỉ những loại nấm thuộc ngành Basidiomycota và Agaricomycetes. Nấm quả thể được biết đến với hai dạng: nấm ăn được và nấm độc. Nấm ăn được sử dụng rộng rãi làm thực phẩm, chúng có thể sử dụng trong rất nhiều món ăn, ở nhiều nền ẩm thực khác nhau. Nấm là thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, có độ đậm cao và ít chất béo, chứa nhiều vitamin nhóm B và C.

Các loài nấm đảm bảo ăn được như các giống nấm mõ (*Agaricus bisporus*), nấm rơm (*Volvariella volvacea*), mộc nhĩ (*Auricularia*), nấm hương (*Lentinus*), ngân nhĩ (*Tremella*)... đang trở thành đối tượng chủ yếu trong công nghệ nuôi trồng nấm ăn.

2.1.3.1. Đặc điểm sinh học của nấm mủ

Nấm mủ là vi sinh vật nhưng không gọi là vi nấm. Phần mủ là cơ quan sinh sản, phần thân dạng sợi có kích thước như sợi nấm mốc.

Nấm nói chung và nấm mủ nói riêng có nhiều đặc điểm khác với thực vật:

+ Nấm không có khả năng quang hợp, nghĩa là nấm không tự tổng hợp các chất hữu cơ từ nước và khí CO₂ nhờ ánh nắng mặt trời. Nấm lấy chất hữu cơ từ các nguồn hữu cơ khác.

+ Vách tế bào nấm chủ yếu là chitin và glucan.

+ Nấm dự trữ đường dưới dạng glucogen thay vì tinh bột.

Vì lý do đó, người ta tách nấm ra khỏi giới thực vật và thành lập một giới riêng, gọi là giới nấm.

Thực tế, nấm sinh trưởng gồm hai giai đoạn:

a) Hệ sợi nấm hay "thân, rễ" của nấm

Các sợi nấm mảnh, nhỏ, dễ nhìn thấy ở bịch giống nấm. Khi cây giống nấm vào nguyên liệu, những sợi nấm mọc dài mảnh và phân nhánh. Trong lúc mọc dài, các nhánh ngang gặp nhau nối lại thành mạng nổi, đó là hệ sợi nấm (tương ứng với thân của cây). Nhờ tạo mạng nổi mà hệ sợi nấm thành một khối thống nhất, các chất dinh dưỡng bên trong khối hệ sợi nấm có thể vận chuyển từ chỗ này tới chỗ khác, ví như cây trồng có thể hút nước và muối khoáng từ đất đưa lên ngọn.

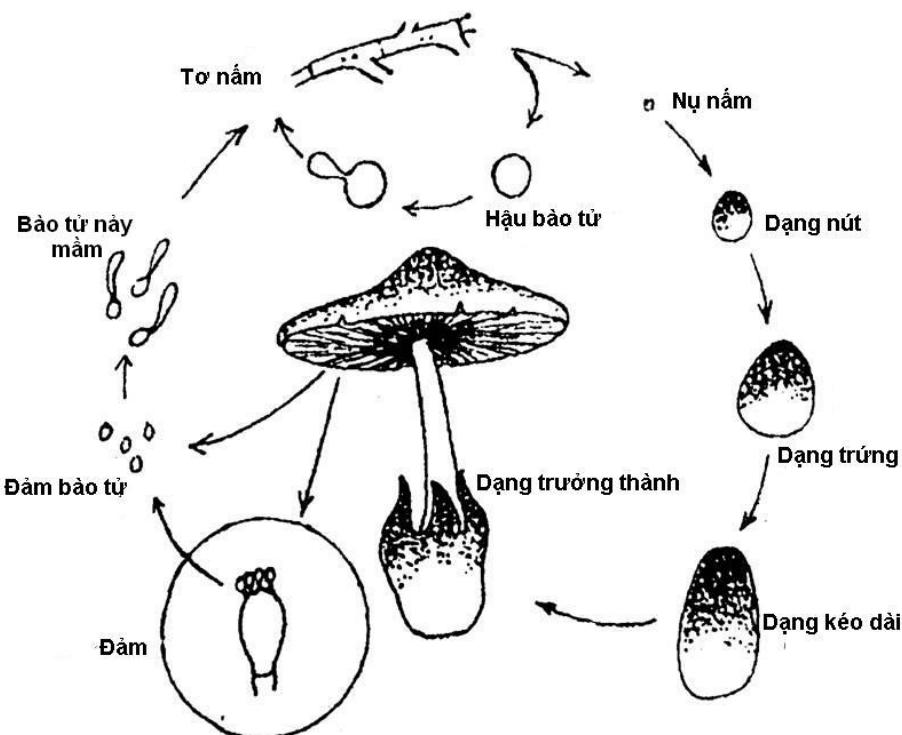
b) Quả thể nấm và bào tử nấm

Khi nấm trưởng thành, dưới mủ nấm có các phiến mỏng (phiến nấm) hay óng tròn nhỏ li ti. Các phiến nấm hay óng nhỏ là phần để sinh ra các bào tử, bào tử tương tự như hạt của cây trồng. Bào tử là những hạt nhỏ tròn hay bầu dục có đường kính vài phần nghìn millimet giữ vai trò sinh sản giống như hạt của cây. Nấm có vô số bào tử, một quả thể nấm trưởng thành có hàng tí bào tử. Khi nấm già mà không được hái, cây nấm sẽ nứt bao, xòe ô và phát tán bào tử, các bào tử rơi vào không khí hay bay đi xa, bám vào rơm rạ, gỗ, đất. Gặp điều kiện thuận lợi như độ ẩm, nhiệt độ thích hợp, chúng nảy mầm tạo nên sợi tơ nấm.

Sợi tơ nấm mọc thành hệ sợi, có đủ dinh dưỡng và điều kiện môi trường tốt sẽ mọc ra nấm. Điều này giải thích vì sao nấm mọc ngoài tự nhiên mà không cần cây giống nấm.

Sau khi tìm hiểu các vấn đề nêu trên, có thể nói như sau: nấm là một sinh vật, phần mà chúng ta thường nhìn thấy được gọi là "cây nấm" chính là quả thể của nấm. Nó tương đương với hoa, quả ở các loài thực vật thường đẳng; trong quả thể có bào tử; các bào tử tương đương với hạt; còn thân, rễ là hệ sợi nấm. Chu kỳ và các giai đoạn sống của

nấm rơm được thể hiện trên hình 2.7 là chu kỳ diễn hình của nấm ăn (nấm lớn có thể ăn được).



Hình 2.7. Chu kỳ sống của (*Volvariella volvacea* – nấm rơm).

2.1.3.2. Ý nghĩa của việc trồng nấm với bảo vệ môi trường

Hoạt động sản xuất nói chung và sản xuất nông nghiệp nói riêng thường gây ô nhiễm môi trường do sử dụng phân bón hóa học, sử dụng thuốc bảo vệ thực vật, đốt bỏ sản phẩm phụ... dẫn đến môi trường ô nhiễm, khí hậu biến đổi. Việc tận dụng những phế phụ liệu của ngành nông nghiệp để nuôi trồng nấm ăn và nấm dược liệu có ý nghĩa góp phần giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường, giảm biến đổi khí hậu.

Nguồn phế thải của nông nghiệp rất lớn gồm: rơm rạ, thân, lõi ngô, thân cây lạc, bã mía... Những thứ này nếu thải ngay ra môi trường thì phải cần một thời gian khá dài để phân hủy, nếu đốt sẽ tạo ra nhiều khí CO₂ và một lượng lớn tro ngầm xuống đất cũng gây bất lợi cho cây trồng. Phần lớn lượng phế phụ phẩm sau khi thu hoạch ở một số địa phương đều bị đốt bỏ ngoài đồng ruộng hoặc ném xuống kênh rạch, sông ngòi gây tắc nghẽn dòng chảy. Đây là nguồn tài nguyên rất lớn nhưng chưa được sử dụng hết, nếu đem trồng nấm không những tạo ra loại sản phẩm có giá trị cao mà phế liệu sau khi thu hoạch nấm cũng được chuyển sang làm phân bón hữu cơ tạo thêm độ phì nhiêu cho đất.

2.2. VI TẢO (Microalgae)

2.2.1. Đặc điểm chung

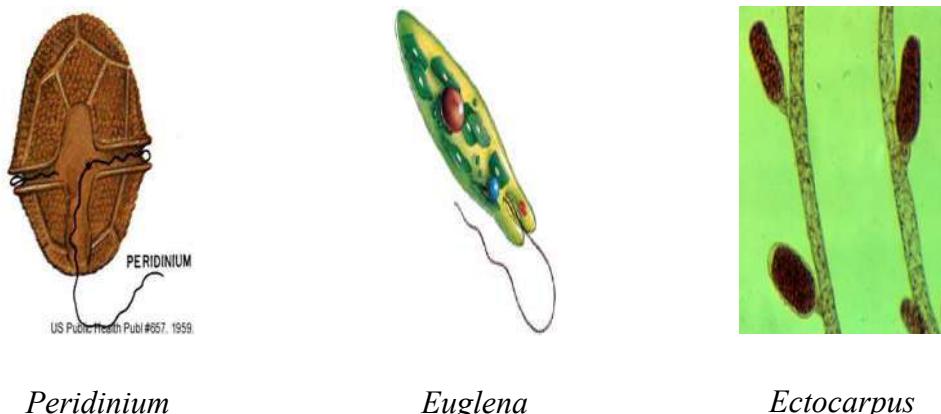
Vi tảo (Microalgae) là tên gọi để chỉ tất cả các loài tảo có kích thước hiển vi có sắc tố quang hợp chlorophyll a, quang tự dưỡng, sống chủ yếu ở trong nước và những nơi có độ ẩm của nước, có ánh sáng. Chúng thuộc về nhiều nhóm phân loại khác nhau; tảo măt, tảo vàng ánh, tảo lục, tảo silic, tảo giáp. Vi tảo có khả năng sinh sản vô tính lẩn hưu tính và với tốc độ hết sức nhanh.

2.2.2. Đời sống của vi tảo

Nhiều loài vi tảo có đời sống trôi nổi. Chúng là thành phần chủ yếu của thực vật phù du. Chúng trôi nổi được trên bề mặt lớp nước và là mắt xích thức ăn đầu tiên của mọi sinh vật sống trong nước.

Có những loài vi tảo suốt đời bám vào các hòn đá, các cành cây dưới đáy nước. Rất nhiều loài sống trên mặt đất (tảo silic, tảo măt, tảo lục...). Chúng một mặt làm giàu thêm chất hữu cơ cho đất nhưng cũng có khi trở thành những kẻ cạnh tranh chất khoáng đối với cây trồng.

Vi tảo đơn giản nhất là cơ thể đơn bào, hoặc tập hợp đơn bào, có thể có roi như *Clamydomonas*, *Peridinium* và *Euglena* (tảo măt), hoặc không có roi như *Chlorella* (tảo lục), *Diatomia* (tảo silic) (hình 2.8).



Hình 2.8. Hình dạng một số loài vi tảo.

(*Peridinium*, US public Health pool# 657, 1959

Ectocarpus, <http://pr-energy.info/usa/ectocarpus-life-cycle.usa>).

Các vi tảo thường gấp hơn là các cơ thể đa bào hoặc tập hợp đơn bào, như các tập đoàn *Volvox*, *Pediastrum*, *Scenendesmus* (thuộc nhóm *Archethalle*) hoặc phức tạp hơn có bộ phận đính bám và bộ phận dựng đứng như các sợi mảnh phân nhánh hoặc không (có thể có vách ngăn tạo thành các tế bào tương đối lập hoặc không có vách ngăn như một ống cộng bào (*coenocytic*)). Những tảo này sinh sản bằng cách phân chia những tế bào lìa ở giữa hoặc bằng cách rụng tế bào ở đầu cùng (*Sphaelaria*, *Ectocarpus*...), chúng

sinh sản hữu tính bằng tiếp hợp đằng giao (hai giao tử bằng nhau) hoặc dị giao (hai giao tử khác nhau).

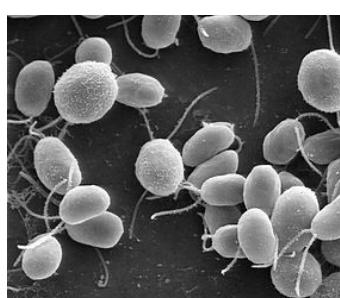
Các sắc tố quang hợp và hỗ trợ ở các nhóm tảo khác nhau thì khác nhau, hiện nay người ta đã biết sáu nhóm tảo với các sắc tố đã được nghiên cứu tương đối kỹ. Bốn giống tảo lục là *Clamydomonas* (đơn bào hai roi), *Gonium* (tập hợp đơn bào hai roi), *Pandorina* (tập hợp đơn bào, phía ngoài còn có hai roi, phía trong mốt roi) và *Volvox* (tập hợp đơn bào, phía ngoài có hai roi làm chức năng di động cho cả tập đoàn, phía trong tế bào mốt roi làm chức năng quang hợp, hô hấp) là một ví dụ rõ nét chứng minh sự tiến hóa từ tổ chức đơn bào lên tổ chức đa bào phân hóa thô sơ.

Theo phân loại của Robert Edward Lee, 1999, tảo được phân thành nhiều ngành do sự khác nhau về sắc tố (pigment), chất dự trữ, cấu trúc đặc điểm của roi (flagella) và các dấu hiệu khác. Riêng ngành tảo lam (Cyanophyta) hay vi khuẩn lam (Cyanobacteria) gồm những cơ thể tế bào chưa có cấu trúc nhân hoàn chỉnh, vì vậy hiện nay khoa học xếp vào nhóm cơ thể tiền nhân (Prokaryote).

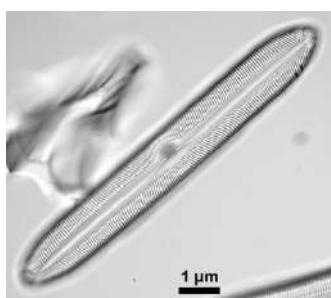
2.2.3. Vai trò của vi tảo trong môi trường

Lợi dụng tốc độ phát triển đặc biệt nhanh của các loài vi tảo và giá trị dinh dưỡng cao của chúng (giàu protein và vitamin), từ lâu người ta đã tìm cách cây nuôi vi tảo theo quy trình công nghiệp và thủ công nghiệp.

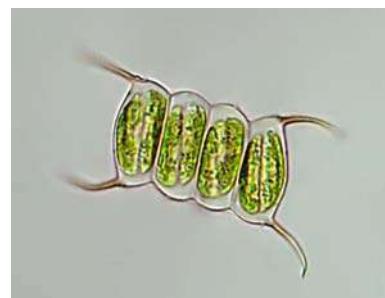
Các loài vi tảo được tuyển chọn vào sản xuất sinh khối làm thức ăn cho tôm cá có nhiều loài song đáng chú ý là các loài thuộc chi *Chlamydomonas*, *Pinnularia* và chi *Scenedesmus* (hình 2.9). Người ta cho rằng trên “các cánh đồng vũ trụ” dành cho các chuyến bay dài ngày, cây trồng lý tưởng nhất chắc chắn phải là vi tảo. Khả năng quang hợp của vi tảo vượt gấp 5 – 6 lần so với cây trồng (sau 24 giờ có thể tăng sinh khối lên 1 000 lần). Chúng có thể thải ra một lượng oxy mỗi ngày gấp 200 lần thể tích của chúng. Chỉ cần 50 lít dịch nuôi cây tảo *Chlorella* có thể cung cấp đủ oxy cho một nhà du hành vũ trụ, mặt khác sinh khối *Chlorella* có thể coi là bổ hơn tất cả các loại thực phẩm thông thường khác. Một số vi tảo sống ở biển có độc tính cao và có thể gây chết hàng loạt động vật thủy sinh.



a) *Chlamydomonas reinhardtii*



b) *Pinnularia opulenta*



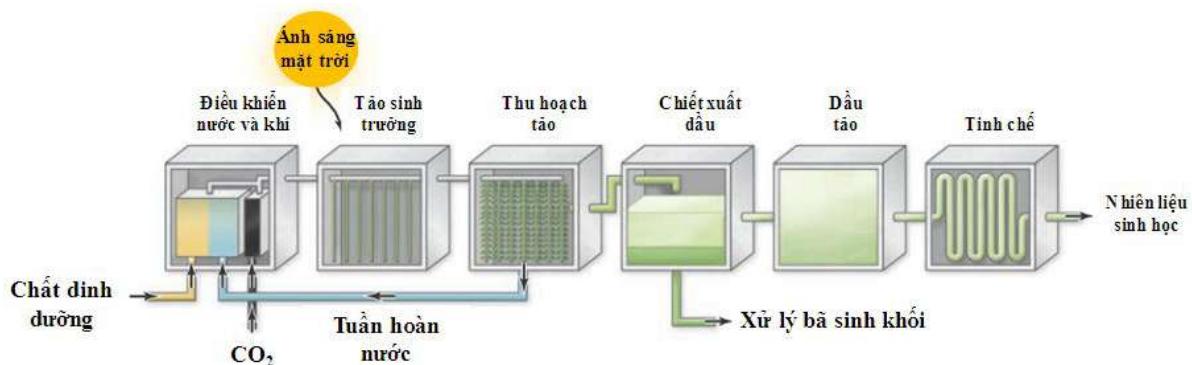
c) *Scenedesmus quadricauda*

Hình 2.9. Hình thái một số vi tảo dùng để sản xuất sinh khối protein.

(Join Parltrees et al., 2013)

Vi tảo sinh trưởng trong điều kiện thích hợp tích lũy đến 50% lipid trong sinh khối. Trong công nghiệp, sinh khối tảo được sản xuất bằng sử dụng các bình nuôi sinh khối sử dụng ánh sáng mặt trời (hình 2.10). Lipid được chiết xuất và tinh chế để sản xuất nguyên liệu sinh học.

Tảo là sinh vật tự dưỡng tạo ra oxy đầu tiên, mặc dù một số loài vẫn duy trì dị dưỡng hóa học bằng cách sử dụng các hợp chất hữu cơ đơn giản để giúp quá trình trao đổi chất của tế bào. Quá trình quang hợp tạo ra oxy và năng lượng không những giúp cho tảo phát triển mà còn đóng vai trò như sinh vật sản xuất ở môi trường nước. Sinh vật sản xuất này là mắt xích trong lưới thức ăn ở môi trường nước như vai trò của thực vật.



Hình 2.10. Sản xuất nguyên liệu sinh học từ nuôi sinh khối vi tảo (Raven et al., 2017).

Một số loài trùng tảo ở vùng duyên hải có khả năng sản xuất hợp chất thứ cấp tạo thành độc chất và tiết ra môi trường. Hai loài trùng tảo *Gymnodinium* và *Gonyaulax* tạo ra độc chất satoxin tác động đến hệ thần kinh làm bại liệt cơ ở hệ hô hấp động vật có xương sống. Với nồng độ thấp (μg), độc chất không ảnh hưởng đến các loài tôm, cua và hai mảnh vỏ, nhưng lại có hại khi tiêu thụ chúng. Bệnh Ciguatera gây ra bởi tiêu thụ các loài hải sản trên đã tích lũy độc tố từ trùng tảo *Gambierdiscus toxicus*. Độc tố vẫn tồn tại sau khi nấu chín hải sản và gây bệnh rối loạn hệ thần kinh trung ương. Tích lũy độc tố ở hải sản thường xảy ra trong quá trình “tảo nở hoa”, “thủy triều đỏ”. Tảo nở hoa và thủy triều đỏ đang là vấn nạn của nhiều quốc gia và thế giới. Có nhiều nguyên nhân, trong đó có việc tăng chất dinh dưỡng, đặc biệt là N và P, từ nước thải và từ hoạt động sản xuất nông nghiệp.

2.3. ĐỘNG VẬT NGUYÊN SINH

2.3.1. Đặc điểm chung

Động vật nguyên sinh (ĐVNS) *Protozoa* là những sinh vật đơn bào có khả năng chuyển động. Động vật nguyên sinh có khoảng 20.000 đến 25.000 loài, trong đó một số có cả khả năng quang hợp.

Hình thái của *Protozoa* rất đa dạng do không có thành tế bào bao quanh. Độ cứng của tế bào do cấu tạo gelatin nằm bên ngoài màng tế bào. Màng tế bào kết hợp với màng gelatin tạo thành một lớp da mỏng bao quanh tế bào. Bên trong lớp da mỏng là dịch nội bào chứa các cầu tử.

Protozoa là một dạng sống đơn giản, mặc dù cơ thể chỉ có một tế bào, nhưng có khả năng thực hiện đầy đủ các hoạt động sống như một cơ thể đa bào hoàn chỉnh, chúng có thể thu lấy thức ăn, tiêu hóa, tổng hợp, hô hấp, bài tiết, điều hòa ion và điều hòa áp suất thẩm thấu, chuyển động và sinh sản. Sở dĩ chúng có thể thực hiện được các hoạt động sống đó là vì trong cơ thể cũng có những cầu tử giống với các cầu tử ở tế bào của cơ thể đa bào như nhân, ty thể, mạng nội chất, hệ Glogi, không bào co bóp và không bào tiêu hóa. Một số nguyên sinh động vật còn có bào hầu nối liền bào khẩu với túi tiêu hóa, tiêm mao hoặc roi hoạt động được nhờ thể gốc. Động vật nguyên sinh thường có kích thước 0,01 – 0,05 mm.

Những ĐVNS đầu tiên đã được Leeuwenhoek A.V phát hiện ra ngay từ thế kỷ XVII nhưng được nghiên cứu vào thế kỷ XVIII bởi Joblot L. và nhiều tác giả khác.

2.3.2. Các nhóm động vật nguyên sinh

Theo hệ thống phân loại hiện nay thì ĐVNS được chia làm bốn nhóm:

(1) *Sarcomastigophora* với các nhánh *Sarcodina* hay *Rhizopodes* (*Rhizopodes* và *Actinopodes*), nhánh *Mastigophora* hay *Flagelles*, nhánh *Opalinata* (cũng có tài liệu hợp nhất *Rhizopodes* và *Flagelles* vào dạng *Rhizoflagelles*). Chúng di chuyển và bắt mồi bằng cách tạo ra các giả túc. Diễn hình của nhóm này là *Amoeba proteus*. Chúng dinh dưỡng bằng cách thực bào và phân bố rộng rãi trong đất và trong nước.

(2) *Sporzoa* (ký sinh trên động vật, một hoặc nhiều vật chủ).

(3) *Cnidospora* (ký sinh trên động vật có xương và không xương).

(4) *Ciliophora* hay *cilie* (roi ngắn -*cils*, có hai loại nhân: nhân to và nhân bé).

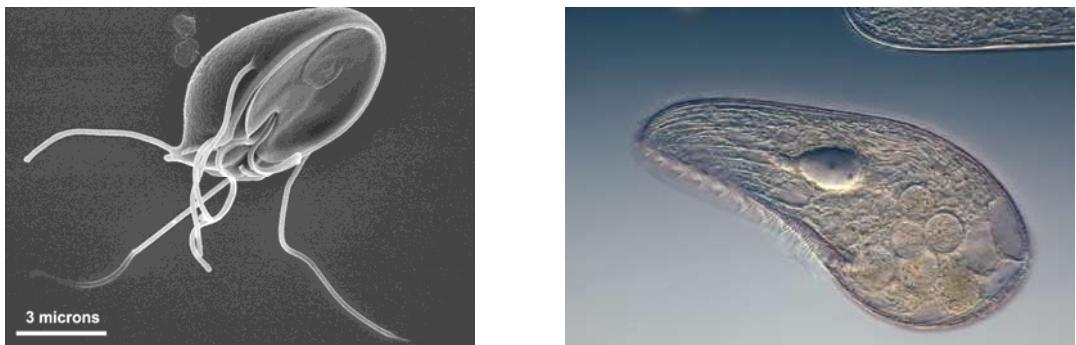
Với hơn 30.000 loài được mô tả, động vật nguyên sinh sống ở đất và nước, nhiều động vật nguyên sinh có vai trò quan trọng ở các lớp bùn hoạt tính tại các trạm lọc nước thải (hình 2.11).

2.3.3. Vai trò của động vật nguyên sinh trong môi trường

Động vật nguyên sinh có nhiều vai trò quan trọng trong hệ sinh thái. Nhiều động vật nguyên sinh hóa tự dưỡng bằng cách hô hấp hiếu khí hoặc lên men. Điều ngạc nhiên là mặc dù động vật nguyên sinh hô hấp hiếu khí nhưng không sở hữu ty thể thực như sinh vật nhân thực. Vì vậy, chúng sử dụng cấu trúc màng bao được gọi là thể hydro (hydrogenosome) để tạo năng lượng. Thể hydro sử dụng proton như chất nhận điện tử để tạo nên phân tử H₂ thay cho H₂O.

Động vật nguyên sinh có vai trò quan trọng trong phân hủy và tuần hoàn các hợp chất hữu cơ trong môi trường. Chúng tiết ra enzyme ngoại bào để phân hủy các hợp chất như cellulose của thực vật, peptidoglycan của thành tế bào vi khuẩn. Một số ĐVNS thực

bào vi khuẩn tiết enzyme giúp cho việc tiêu hóa vi khuẩn. Một số khác sau khi thực bào vi khuẩn thì phân hủy bằng các enzyme tiêu hóa có trong không bào thực bào. Khả năng phân hủy đại phân tử đóng vai trò quan trọng trong mối quan hệ giữa ĐVNS và động vật khác. Thực tế, ĐVNS tiêu hóa 1/3 chất xơ ở động vật nhai lại và cung cấp sinh khối vi sinh cho dạ dày. Trong môi trường ký sinh của dạ dày, ĐVNS thực hiện quá trình lên men để tạo ra acid hữu cơ và cồn.



**Hình 2.11. Một số loại động vật nguyên sinh
Giardia muris (trái) và *Blepharisma japonicum* (phải) (Raeky, 2009).**

ĐVNS đóng vai trò quan trọng liên quan đến chất lượng nước. ĐVNS gây ra các đại dịch thông qua nước uống và nước dành cho ngành giải trí. Các ĐVNS thường ảnh hưởng đến chất lượng nước bao gồm: *Giardia* (*Mastigophora*), *Cryptosporidium* (*Apicomplexa*) và *Toxoplasma* (*Apicomplexa*). Nguồn gốc là do các bao nang và noãn bào của những loài này có thể chống lại được nhiệt độ cũng như độ mặn của nước và có thể tồn tại dài ngày. Một số khác tồn tại trong đất và gây ra chứng viêm não ở người, có thể dẫn đến tử vong như *Naegleria fowleri* và *Balamuthia mandrillaris*.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Vi sinh vật nhân thực có cấu trúc phức tạp hơn vi sinh vật nhân sơ, có nhân thực và xoang hóa (màng bao quanh các bào quan), có cấu tạo tế bào hoàn chỉnh, nhân có màng nhân, có ti thể, có bộ máy Golgi và lưới nội chất tạo nên các ống và xoang dẹp thông với nhau ở bên trong tế bào. Nhóm này gồm: vi nấm, vi tảo và động vật nguyên sinh, thực vật và động vật.

Vi nấm là những sinh vật nhân thực, hè sợi, phần lớn có thành tế bào chứa chitin, không có lục lạp, không có lông và roi. Sống dị dưỡng hoại sinh, ký sinh, cộng sinh. Sinh sản chủ yếu bằng bào tử. Các cơ thể vi nấm có kiểu trao đổi chất và hệ enzyme khác biệt so với các cơ thể nhân thực khác (thực vật, động vật) và khác xa với cơ thể nhân sơ nên từ lâu đã được xếp thành một giới riêng – đó là giới nấm (*Regnum Fungi*).

Nấm men là tên gọi thông dụng để chỉ một nhóm vi nấm đơn bào, nhân có màng nhân, sinh sản chủ yếu theo kiểu nảy chồi. Thường tồn tại trong các môi trường có nồng độ đường cao, pH thấp. Nấm men không phải là một nhóm nấm riêng biệt mà thuộc nhiều nhóm khác nhau trong giới nấm: Nấm túi (*Ascomycetes*), Nấm đầm (*Basidiomycetes*) và Nấm bát toàn (*Deuteromycetes*). Nấm men được dùng nhiều trong công nghệ chế tạo các hợp chất hữu cơ quan trọng và để sản xuất sinh khối giàu protein làm thức ăn trong nuôi trồng thủy sản.

Nấm sợi gồm những sinh vật nhân thực, dạng sợi, không có lục lạp, không có lông và roi, có đời sống dị dưỡng: hoại sinh, ký sinh hoặc cộng sinh. Nhiều nấm sợi có khả năng tiết kháng sinh, enzyme, chất kích thích sinh trưởng... Bên cạnh đó, nhiều nấm sợi gây bệnh, sinh độc tố gây ngộ độc thức ăn như *Aspergillus flavus*, gây tổn thất trong nuôi trồng thủy sản.

Vi tảo (Microalgae) là tên gọi để chỉ tất cả các loài tảo có kích thước hiển vi có sắc tố quang hợp. Chúng thuộc về nhiều nhóm phân loại khác nhau; tảo mắt, tảo vàng ánh, tảo lục, tảo silic, tảo giáp. Vi tảo có khả năng sinh sản vô tính lẩn hữa tính và với tốc độ hết sức mạnh. Lợi dụng tốc độ phát triển đặc biệt nhanh của các loài vi tảo và giá trị dinh dưỡng cao của chúng (giàu protein và vitamin), từ lâu người ta đã tìm cách cây nuôi vi tảo theo quy trình công nghiệp và thủ công nghiệp. Tuy nhiên, cũng có một số loài tảo khi gặp điều kiện thuận lợi phát triển quá nhanh do phú dưỡng hóa nguồn nước gây hiện tượng “nước nở hoa” độc hại, thủy triều đỏ khiến cá chết hàng loạt ở nhiều quốc gia trên thế giới như Mỹ, Mexico, Canada, Trung Quốc và Việt Nam... có thể sản sinh các độc tố tự nhiên, làm suy giảm oxy và gây ra các tác hại khác.

Động vật nguyên sinh là một dạng sống đơn giản, chỉ có một tế bào; sống dị dưỡng, có đầy đủ các bào quan như nhân, ty thể, lưỡi nội chất, bộ máy Golgi, không bào co bóp và không bào tiêu hóa. Nhiều loài được dùng làm thức ăn cho động vật nhỏ, chúng là sinh vật chỉ thị về độ sạch của môi trường nước. Một số trong chúng là tác nhân gây bệnh ở người và động vật như bệnh sốt rét, bệnh ly...

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Các nhóm vi sinh vật nhân thực? Phân biệt vai trò của nấm men và nấm sợi?
2. Đặc điểm chung của các vi sinh vật nhân thực?
3. Vai trò của các loại vi sinh vật nhân thực trong bảo vệ môi trường?
4. Nếu một số nấm sợi có lợi và gây hại cho môi trường và con người?
5. Các nhóm tảo? Hiện tượng “nước nở hoa”?
6. Vai trò của động vật nguyên sinh trong xử lý và bảo vệ môi trường?
7. So sánh tổng quát sự khác biệt của nấm men và nấm sợi.

* Chọn một đáp án đúng nhất

8. Đặc điểm có ở giới nấm (fungi) và không có ở giới nguyên sinh (protista)
 - a. Cơ thể đơn bào.
 - b. Thành tế bào có chứa chất chitin.
 - c. Cơ thể đa bào.
 - d. Có lối sống dị dưỡng.
9. Protista gồm:
 - a. Các VSV là tảo đơn bào, tập hợp đơn bào.
 - b. Những VSV nhân thực.
 - c. Không bao giờ là tác nhân gây bệnh.
 - d. Những VSV có chân giả (*pseudopods*).
10. Diền vào bảng so sánh một số đặc điểm giữa vi khuẩn, vi nấm và vi tảo

Đặc điểm so sánh	Vi khuẩn	Vi nấm	Vi tảo
a. Loại ribosome tế bào chất			
b. Chất đặc trưng ở thành tế bào			
c. Dạng dự trữ glucose			
d. Quan hệ với oxy			

* Diền vào các chỗ trống

11. Nấm là sinh vật thuộc dạng tế bào.....(a).....Cơ thể có thể đơn hay đa bào dạng sợi, có thành.....(b).....(một số ít có thành.....(c).....), không có.....(d).....sóng dị dưỡng theo kiểu.....(e)..... Sinh sản bằng.....(f).....không có.....(j).....và.....(i).....

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. **Nhân tế bào (Nucleus):** là bào quan tối quan trọng trong tế bào sinh vật nhân thực. Nó chứa các nhiễm sắc thể của tế bào, là nơi diễn ra quá trình nhân đôi DNA và tổng hợp RNA.
2. **Sinh vật nhân thực (eukaryote),** còn gọi là sinh vật nhân diễn hình – nhân có màng nhân gồm có động vật, thực vật và nấm – hầu hết chúng là sinh vật đa bào – cũng như các nhóm đa dạng khác được gọi chung là nguyên sinh vật (đa số là sinh vật đơn bào). Sinh vật nhân thực có cùng một nguồn gốc và thường được xếp thành một siêu giới hoặc *vực* (domain). *Eukaryote* là chữ Latinh có nghĩa là có nhân thực sự.
3. **Vỏ polysaccharide:** một số chủng VSV có thể tạo vỏ polysaccharide. Vỏ này cùng với protein A có chức năng bảo vệ vi khuẩn chống lại hiện tượng thực bào.

Chương 3

VIRUS HỌC

Mục tiêu

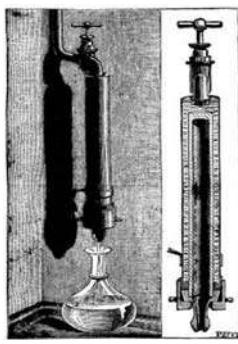
- Nắm vững tính chất, hình thái cấu trúc của hạt virus.
- Hiểu được lịch sử phát hiện virus và các thực thể dưới virus.
- Trình bày được cấu tạo, đặc điểm, quá trình nhân lên của virus, phage.
- Nắm được những lợi ích của các nhóm virus đã học để có thể vận dụng những hiểu biết này vào thực tế đời sống và bảo vệ môi trường.

3.1. LỊCH SỬ PHÁT HIỆN VIRUS

Trước đây virus được coi là một chất độc luôn gắn liền với bệnh tật. Thuật ngữ “virus” cũng bắt nguồn từ tiếng Latinh “Virus” có nghĩa là chất độc. Vào năm 1883, nhà khoa học người Đức Adolf Mayer (1843 – 1942) khi nghiên cứu bệnh khâm cây thuốc lá đã nhận thấy bệnh này có thể lây nếu phun dịch ép lá cây bị bệnh sang cây lành, tuy nhiên ông không phát hiện được tác nhân gây bệnh.

Năm 1884, Charles Chamberland đã sáng chế ra màng lọc bằng sứ để tách các vi khuẩn nhỏ nhất (hình 3.1).

Năm 1892, nhà thực vật học người Nga Dmitri Iwanowski đã dùng màng lọc Chamberland để nghiên cứu bệnh khâm thuốc lá. Ông nhận thấy dịch ép lá cây bị bệnh đã cho qua màng lọc vẫn có khả năng nhiễm bệnh cho cây lành. Mặc dù không nhìn thấy bất kì VSV nào nhưng ông cũng thông báo rằng chính “virus qua lọc” là tác nhân gây bệnh.



Hình 3.1. Dmitri Iwanowski (1864 – 1920); Màng lọc bằng sứ; Bệnh khâm thuốc lá.

Giả thuyết về độc tố qua màng lọc đã bị bác bỏ vào năm 1898 khi nhà khoa học người Hà Lan Martinus Beijerinck chứng minh được rằng tác nhân lây nhiễm là chất độc sống (a contagious, living fluid) và có thể nhân lên được. Ông tiến hành phun dịch ép lá cây bệnh cho qua lọc rồi phun lên cây và khi cây bị bệnh lại lấy dịch ép cho qua lọc để

phun vào các cây khác. Qua nhiều lần phun đều gây được bệnh cho cây. Điều đó chứng tỏ tác nhân gây bệnh phải nhân lên nên không phải là chất độc vì nếu là độc tố thì năng lực gây bệnh sẽ phải dần mất đi. Chất độc sống không thể gây bệnh khi bị đun nóng.

Năm 1901, Walter Reed và cộng sự của ông ở Cuba đã phát hiện tác nhân gây bệnh sốt vàng cũng là virus qua lọc. Tiếp sau đó, các nhà khoa học khác phát hiện ra tác nhân gây bệnh dại và đậu mùa. Tác nhân gây bệnh đậu mùa có kích thước lớn, không dễ qua lọc, do đó các tác nhân gây bệnh chỉ đơn giản gọi là “virus”.

Năm 1915, nhà vi khuẩn học người Anh Frederick Twort và năm 1917, nhà khoa học người Pháp – Canada Felix d'Herelle thuộc viện Pasteur (Paris) đã phát hiện ra virus ký sinh vi khuẩn và đặt tên là Bacteriophage, gọi tắt là phage (thể thực khuẩn).

Năm 1935, nhà khoa học người Mỹ Wendell Stanley đã kết tinh được các hạt virus gây bệnh đóm thuốc lá (TMV). Đến năm 1941, TMV và nhiều loại virus khác đều có thể quan sát được dưới kính hiển vi điện tử. Như vậy, nhờ có kỹ thuật màng lọc đã đem lại khái niệm ban đầu về virus và sau đó nhờ có kính hiển vi điện tử đã có thể quan sát được hình dạng của virus, tìm hiểu được bản chất và chức năng của chúng.

Cuối những năm 1950, Jonas Salk và Albert Sabin đã phát triển kỹ thuật để nhân số lượng lớn virus gây bệnh bại liệt dùng sản xuất vaccine bại liệt.

Năm 1952, Hershey đã chứng minh vật chất di truyền ở thể thực khuẩn là DNA. Năm 1955, Fraenkel Conrat lắp ráp thành công lõi acid nucleic vào vỏ capsid của virus khâm thuốc lá và 10 năm sau, năm 1965, Spiegelman lắp ráp thành công chuỗi DNA của thể thực khuẩn φX174. Năm 1970, Baltimore và Temin phát hiện enzyme phiên mã ngược ở virus Retro chứa RNA chuỗi đơn.

Ngày nay, virus được coi là thực thể chưa có cấu tạo tế bào, có kích thước siêu nhỏ và có cấu tạo rất đơn giản, chỉ gồm một loại acid nucleic, được bao bởi vỏ protein. Muốn nhân lên virus phải nhờ bộ máy tổng hợp của tế bào, vì thế chúng là ký sinh nội bào bắt buộc.

Virus có khả năng gây bệnh ở mọi cơ thể sống từ vi khuẩn đến con người, là thủ phạm gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi, gây thất bát mùa màng và cản trở đối với ngành công nghiệp vi sinh vật.

Từ những thập kỷ cuối của thế kỷ XX trở lại đây, ngày càng xuất hiện các dạng virus mới lạ ở người, động vật mà trước đó y học chưa hề biết tới, đe dọa mạng sống của con người. Sau HIV, SARS, Ebola, cúm A H5N1, có thể sẽ còn nhiều loại nữa xuất hiện để gây tai họa cho con người.

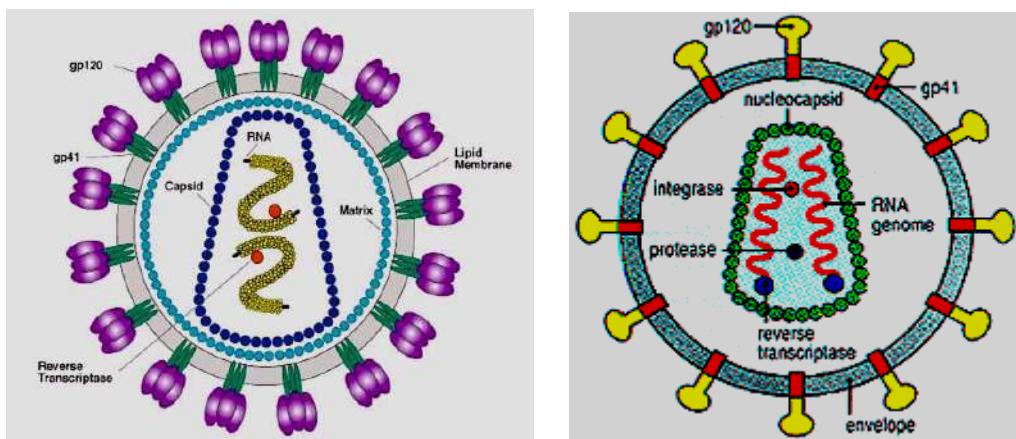
Mặt khác, do có cấu tạo đơn giản và có bộ gene nhiều kiểu với cơ chế sao chép khác hẳn ở các cơ thể khác nên virus được chọn là mô hình lý tưởng để nghiên cứu nhiều cơ chế sinh học ở mức phân tử, dẫn đến cuộc cách mạng sinh học cận đại: sinh học phân tử, di truyền học phân tử. Vì những lý do trên, việc nghiên cứu virus đã được đẩy mạnh và trở thành một ngành khoa học độc lập rất phát triển.

3.2. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA VIRUS

Virus là một kết cấu đại phân tử vô bào, không có hệ thống sinh sản năng lượng, không có ribosome, không sinh trưởng cá thể, không phân cắt và không mẫn cảm với các chất kháng sinh, chỉ chứa một trong hai loại nucleic acid (DNA hoặc RNA), sống ký sinh nội bào bắt buộc. Ngày nay có khoảng 5000 loài virus được định danh, nhưng các nhà khoa học cho rằng có khoảng 400.000 loài tồn tại.

Các đặc điểm của virus:

- Không có cấu trúc tế bào, sống ký sinh nội bào bắt buộc ở vi khuẩn, ĐVNS, nấm, tảo, thực vật và động vật. Mỗi virus nhất định có một tế bào chủ đặc hiệu và gây ra một bệnh nhất định trong quá trình nhân lên.
- Mỗi một virus chỉ chứa một loại acid nucleic, hoặc là DNA (sợi đôi hoặc sợi đơn) hoặc RNA (sợi đôi hoặc sợi đơn) mà không bao giờ chứa cùng một lúc cả hai loại acid nucleic như vi khuẩn.
- Virus không có khả năng tự phát triển và tự nhân lên mà chỉ có thể nhân lên khi xâm nhập vào tế bào sống. Trong quá trình nhân lên chỉ có acid nucleic là có vai trò quyết định, còn các thành phần khác có vai trò hỗ trợ.
- Virus không chứa những thông tin truyền cho việc tổng hợp ra những chất chuyển hóa cơ bản và năng lượng cần thiết cho nó. Chính vì vậy mà virus phải phụ thuộc vào các sinh vật khác, nhân lên bằng cách dùng hệ thống enzyme của tế bào, còn acid nucleic của virus điều khiển việc tổng hợp của tế bào để tạo ra những virus mới.
- Chịu lạnh tốt, không chịu nhiệt, hóa chất và tia tử ngoại. Hầu hết virus không bị kháng sinh tác động đến.
- Khi ở ngoài tế bào, virus ở trạng thái không hoạt động được gọi là virion.

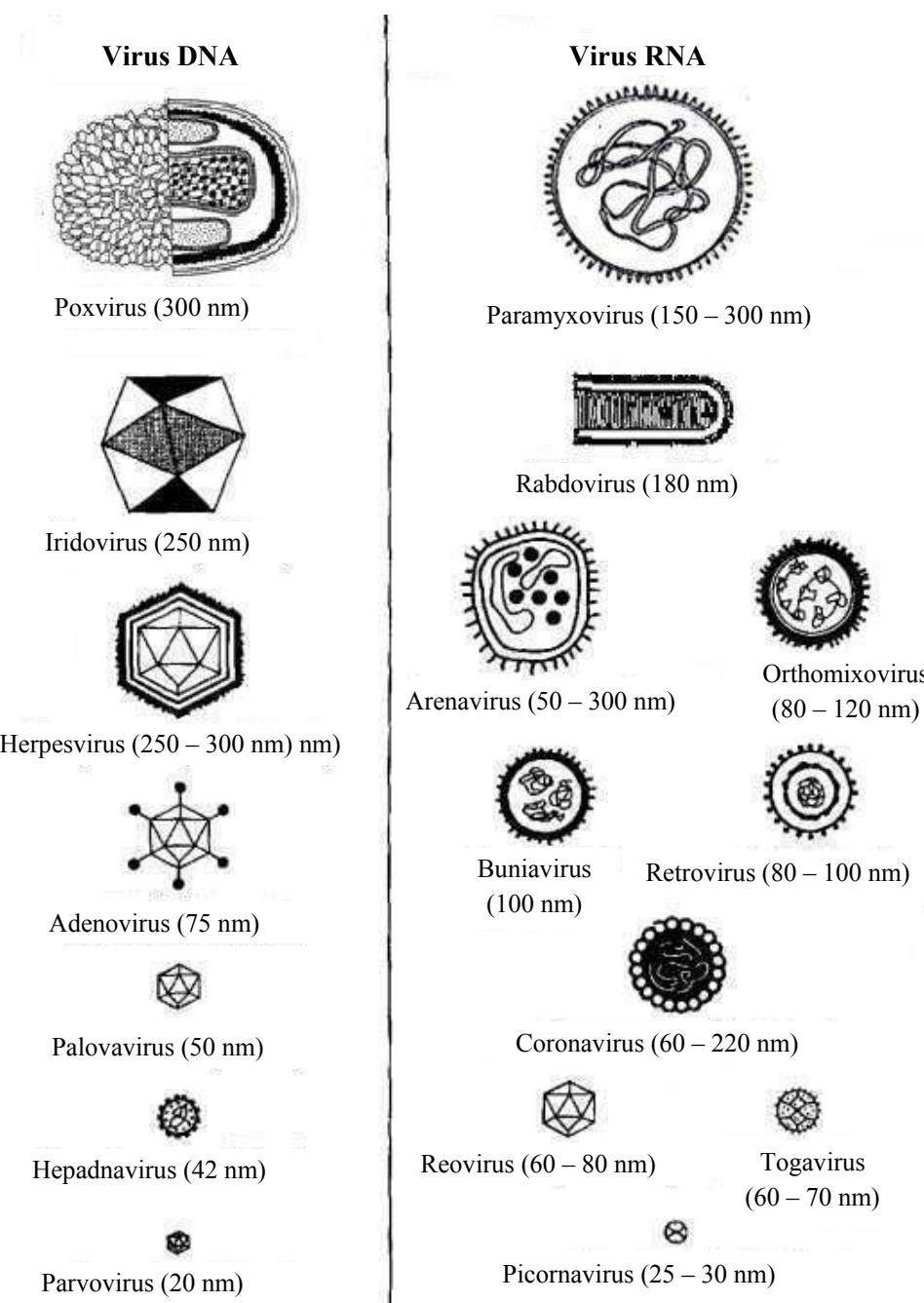


Hình 3.2. Cấu trúc của virion HIV1 (trái) và HIV2 (phải).
(HIV có dạng cầu là vì có vỏ ngoài, còn capsid là hình khối không đều, giống hình nón cùt).

3.3. HÌNH DẠNG, KÍCH THƯỚC VÀ CẤU TRÚC CỦA VIRUS

3.3.1. Hình dạng và kích thước

Virus có hình que, hình sợi, hình cầu, hình khói,... Một số virus trong quá trình phát triển, hình thành trong tế bào mà chúng ký sinh những khói gọi là thể bao hàm (tập đoàn virus), có thể dùng kính hiển vi thường cũng quan sát được.



Hình 3.3. Kích thước và hình dạng một số virus động vật điển hình.

Virus là một dạng sống đơn giản nhất hiện nay, có kích thước nhỏ bé so với tế bào chủ và chỉ quan sát được trên kính hiển vi điện tử. Virus có thể lọt qua lọc vi khuẩn. Hơn 2000 virus ký sinh vi khuẩn có thể chứa trong một tế bào chủ vi khuẩn và hơn 50 triệu virus bại liệt có thể chứa trong tế bào người. Virus động vật có kích thước nhỏ là parvovirus với đường kính chỉ 20 nm, bacteriophage MS2 chỉ 24 nm. Virus RNA Picoviridae có kích thước cỡ 20 – 30 nm, Retroviridae kích thước 100 – 120 nm, Parvoviridae kích thước 18 – 26 nm, Poxviridae 130 – 300 nm (hình 3.3).

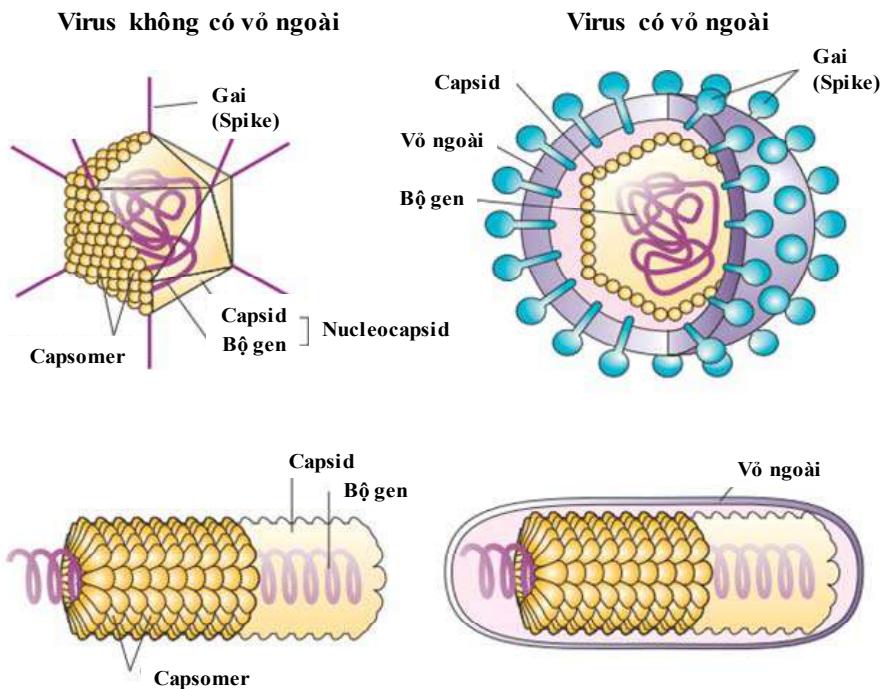
3.3.2. Cấu trúc của virus

Virus có cấu tạo rất đơn giản, bao gồm lõi là acid nucleic, tức genome nằm ở phía trong còn phía ngoài được bao bọc bởi vỏ capsid. Capsid và acid nucleic được gọi là nucleocapsid.

3.3.2.1. Vỏ capsid

Tất cả các loài virus được cấu tạo bởi vỏ capsid bao quanh lõi acid nucleic tạo thành cấu trúc nucleocapsid. Capsid được cấu tạo bởi các đơn vị hình thái gọi là capsomer. Capsomer lại được cấu tạo từ 5 hoặc 6 đơn vị cấu trúc gọi là protomer. Protomer được cấu tạo bởi đa phức hợp protein.

Vỏ capsid bảo vệ bộ gene của virus bên trong bởi được cấu tạo bởi các amino acid chịu được nhiệt độ, pH và sự bất thường của môi trường. Ở một số loài virus có cấu trúc vỏ capsid đặc biệt chứa các phân tử glicoprotein được gọi là gai (spike), giúp virus gắn vào thụ thể đặc hiệu trên mặt tế bào vật chủ và thâm nhập vào trong tế bào.



Hình 3.4. Cấu trúc cơ bản của virus không có vỏ ngoài (trần) và virus có vỏ ngoài.
(Jeffrey et al., 2011).

Virus chỉ có lớp nucleocapsid gồm vỏ capsid và hệ gene được gọi là virus trần túc không có vỏ ngoài.

Lớp nucleocapsid của một số loại virus có lớp protein mềm dẻo bao quanh được gọi là virus có vỏ ngoài. Vỏ ngoài được cấu tạo bởi lipid và protein như màng tế bào vật chủ. Loại virus này mất khả năng xâm nhiễm vào tế bào chủ khi vỏ ngoài bị phá hủy.

– Trên vỏ capsid có pentamer (penton) tạo bởi 5 protomer nằm trên các đỉnh của khối đa diện, còn hexamer (hexon) tạo thành các cạnh và bề mặt hình tam giác.

– Trên mặt capsid chứa các thụ thể đặc hiệu, hay là các gai glycoprotein, giúp cho virus bám vào các thụ thể trên bề mặt tế bào. Đây cũng chính là các kháng nguyên kích thích cơ thể tạo đáp ứng miễn dịch.

– Virus được lắp ráp hoàn chỉnh để xâm nhiễm vào tế bào vật chủ gọi là Virion.

– Vỏ capsid có kích thước và cách sắp xếp khác nhau khiến cho virus có hình dạng khác nhau. Có thể chia ra ba loại cấu trúc: hình trụ có đối xứng xoắn, hình khối đa diện và cấu trúc phức tạp (phối hợp) (hình 3.5).

+ Cấu trúc hình trụ đối xứng: các capsomer liên kết với nhau tạo thành khối trụ rỗng chứa bộ gene ở bên trong. Ví dụ virus không có vỏ ngoài: virus kh大使 thuốc lá; virus có vỏ ngoài: virus gây bệnh cúm, sởi và đại.

+ Cấu trúc khối: vỏ capsid cấu trúc hình khối 20 mặt tam giác đều. Sắp xếp của các protomer tạo thành vỏ capsid biến đổi tùy từng loại virus, có thể được tạo thành từ một đến nhiều loại capsomer khác nhau. Ví dụ: polyvirus có 32 loại, adenovirus có 252 loại. Capsid có cấu trúc hình khối đa diện (virus bại liệt) và khối cầu (HIV).

+ Cấu trúc phối hợp: vừa có dạng khối và dạng xoắn, thường thấy ở thực khuẩn thể (phage). Ví dụ phage T4 có đầu dạng khối và đuôi dạng xoắn.

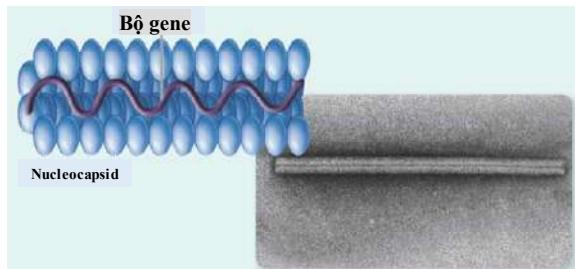
3.3.2.2. Bộ gene của virus

Bộ gene (genome) của virus rất đa dạng về cấu trúc, kích thước và thành phần nucleotide. Chúng có thể là DNA hoặc RNA, chuỗi đơn hoặc kép, thẳng hoặc khép vòng (bảng 3.1).

Dựa vào kiểu bộ gene và dạng mạch, virus được chia thành hai lớp: virus DNA và virus RNA.

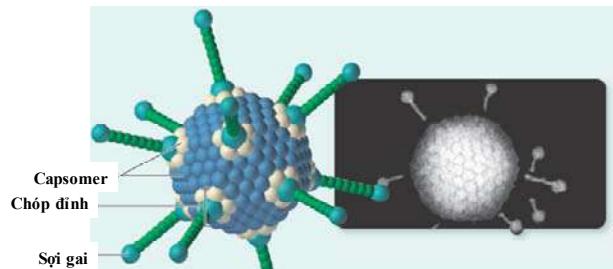
Kích thước genome có thể từ 3500 nucleotide (ở phage nhỏ) đến 560.000 nucleotide (ở virus herpes). Các trình tự genome virus phải được đọc mã bởi tế bào chủ, cho nên các tín hiệu điều khiển phải được các yếu tố của tế bào chủ nhận biết. Các yếu tố này thường liên kết với protein virus. Do có kích thước nhỏ nên genomevirus đã tiến hóa để sử dụng tối đa tiềm năng mã hóa của mình. Vì thế, hiện tượng gene chồng lớp và hiện tượng cắt nối (splicing) mRNA ở virus là rất phổ biến.

Cấu trúc hình trụ

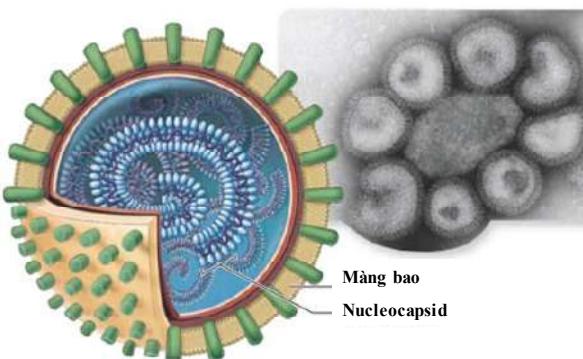


Virus không có vỏ ngoài: khóm thuốc lá

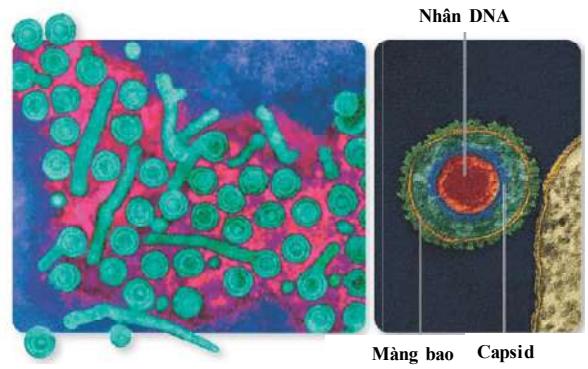
Cấu trúc khói đa diện



Cấu trúc khói đặc trưng virus
không có vỏ ngoài

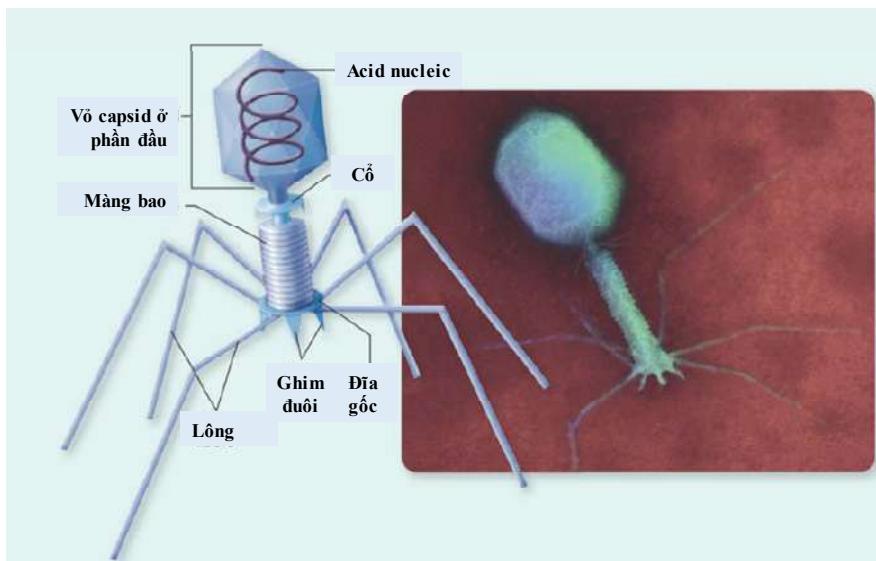


Virus có vỏ ngoài: cúm, sởi, đại



Virus có vỏ ngoài: Viêm gan B (trái)
và Herpes (phải)

Cấu trúc phối hợp



Bacteriophage T4

Hình 3.5. Ba loại cấu trúc thường gặp ở virus (Marjorie Kelly Cowan et al., 2014).

Bảng 3.1. Các dạng genome virus

<i>Loại acid nucleic</i>	<i>Cấu trúc</i>	<i>Ví dụ</i>
DNA đơn	Chuỗi đơn, dạng thẳng	Virus parvo
	Chuỗi đơn, khép vòng	Phage ΦX174, M13, fd
DNA kép	Chuỗi kép, dạng thẳng	Herpes, adeno, coliphage T, phage l. Coliphage T5
	Chuỗi kép, dạng thẳng, trên một mạch có những chỗ đứt ở cầu nối phosphodiester.	Vaccinia, Smallpox
	Chuỗi kép với hai đầu khép kín	Polioma (SV40), papiloma, phage
	Chuỗi kép khép vòng kín	PM2, virus đốm hoa lơ
RNA đơn	Chuỗi đơn, dương dạng thẳng	<i>Picornavirus (polio, rhino), toga, phage</i>
	Chuỗi đơn, âm, dạng thẳng	<i>RNA, MTV và hầu hết virus thực vật</i>
	Chuỗi đơn, dương, dạng thẳng, nhiều đoạn	Rhabdo, paramyxo, (sởi, quai bị)
	Chuỗi đơn, dương genome phân đoạn là 3 phân tử RNA (+)	Virus đốm cây kiều mạch (Bromus) (mỗi phần được bao bởi 1 capsid riêng).
	Chuỗi đơn, âm dạng thẳng, phân đoạn	Retro (HIV, Sarcoma Rous) Orthomyxo (cúm) – genome phân đoạn là 3 phân tử RNA (-)
RNA kép	Chuỗi kép, dạng thẳng, phân đoạn	Reo (rota), một số virus gây u ở thực vật, NPV ở côn trùng, phage j6 và nhiều virus ở nấm (mycovirus), Reoviridae

Kích thước genome thay đổi rất nhiều ở các virus khác nhau. Các genome nhỏ nhất (ví dụ Bacteriophage MS2, Qβ) có kích thước 1×10^6 Da đủ để mã hóa cho 3 – 4 protein. Một số virus khác tận dụng tối đa không gian của genome bằng cách sử dụng các gene chồng llop, tức là các gene gối lên nhau trên cùng khung đọc, chỉ khác nhau ở điểm khởi đầu hoặc kết thúc.

Các genome của coliphage T chǎn, herpes, vaccinia có kích thước $1,6 \times 10^8$ Da có thể mã hóa cho 100 protein.

Một số đặc điểm của genome virus cần lưu ý:

– Genome DNA kép (ví dụ ở virus pox, herpes và adeno) thường có kích thước lớn nhất.

– Genome DNA kép khép vòng (siêu xoắn hoặc không siêu xoắn) thường thấy ở phage.

– Genome DNA kép ở virus vaccinia có hai đầu khép kín.

– DNA đơn dạng thẳng (ví dụ virus parvo) có kích thước rất nhỏ.

– Các DNA dạng thẳng thường có trình tự lặp lại ở đầu.

– Tất cả genome RNA kép đều phân đoạn (chứa một số đoạn không giống nhau, mang thông tin di truyền tách biệt).

– Genome RNA đơn được phân thành RNA dương (genome+) và RNA âm (genome-) dựa vào trình tự nucleotide của mRNA. Phần lớn genome RNA đơn đều không phân đoạn, trừ virus orthomyxo (virus cúm).

– Virus retro có genome là hai phân tử RNA đơn giống nhau, nối với nhau ở đầu 5 nhò cầu nối hydro.

– Virus đóm cây Alfalfa (AMV) có genome gồm bốn đoạn RNA đơn, dương, dạng thẳng, được gói vào bốn vỏ capsid khác nhau nên còn gọi là virus dị capsid (heterocapsidic) để phân biệt với virus mà tất cả các đoạn đều được gói trong một hạt – virus đồng capsid (isocapsidic).

3.4. SỰ NHÂN LÊN CỦA VIRUS

Virus không có hoạt tính trao đổi chất độc lập mà sử dụng bộ máy trao đổi chất của tế bào chủ để tổng hợp các thành phần thiết yếu của mình, sau đó lắp ráp tạo ra các hạt virus con giống như nguyên bản. Vì vậy, người ta thường sử dụng thuật ngữ nhân lên (nhân bản) của virus thay cho từ sinh sản.

Sự nhân lên của virus có thể làm tan tế bào gọi là chu trình sinh tan hoặc có thể gắn genome của virus vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ, tồn tại lâu dài dưới dạng tiềm ẩn mà không làm chết tế bào gọi là chu trình tiềm tan.

Quá trình nhân lên của ở tất cả các virus độc đều diễn ra theo năm giai đoạn:

3.4.1. Hấp phụ

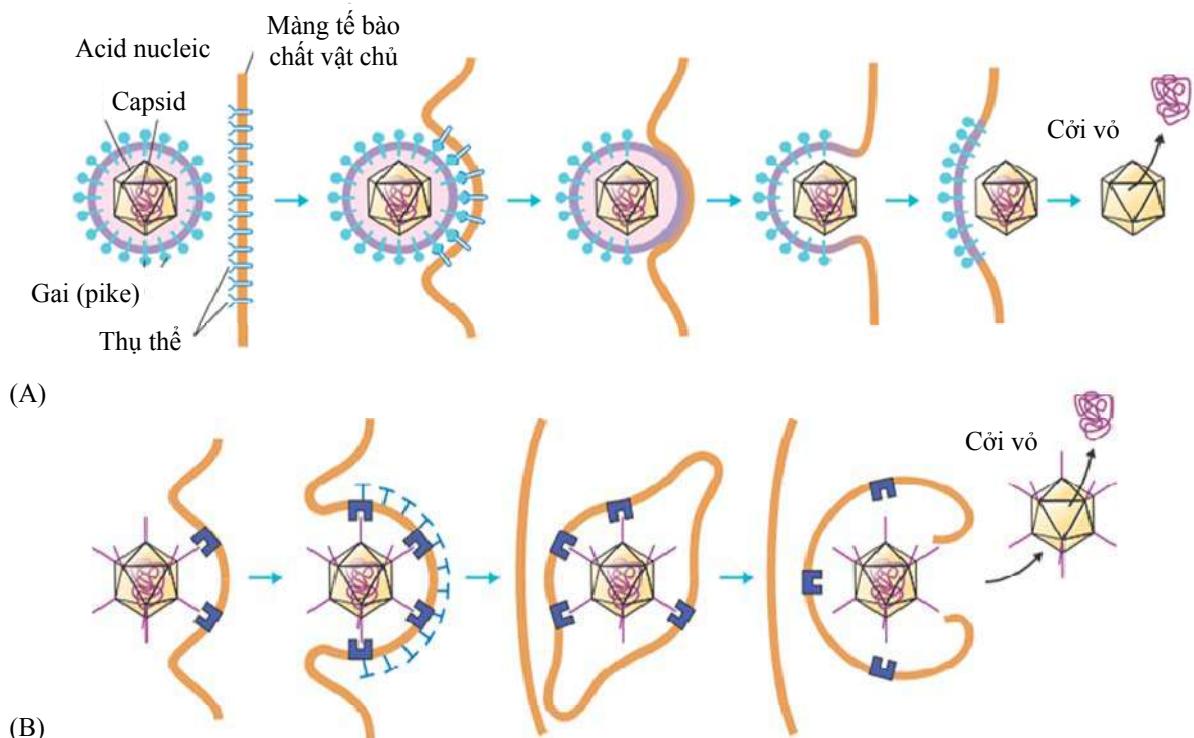
– Gắn thụ thể đặc hiệu của virus lên thụ thể nằm trên màng sinh chất của tế bào. Vì có tính đặc hiệu cao của các gai (spike) hay protein trên vỏ ngoài của virus nên chỉ virus nhất định mới gắn lên được các tế bào nhất định.

3.4.2. Xâm nhập, cởi vỏ và phiên mã

3.4.2.1. Xâm nhập

Sự hấp phụ được tăng cường khi có mặt của ion Mg^{2+} hoặc Ca^{2+} .

– Virus không có vỏ bên ngoài: Màng tế bào lõm vào bao lấy virus tạo không bào tạm thời endosome. Tiếp đó không bào dung hợp với lisosome. Bơm proton H^+ vào lisosome, hạ pH 5 – 5,5. Enzyme trong lisosome hoạt động hóa phân giải nucleocapsid, giải phóng genome vào tế bào chất.



Hình 3.6. Các phương thức xâm nhập của virus vào tế bào (Jeffrey et al., 2011).

A. Virus có vỏ bên ngoài; B. Virus không có vỏ bên ngoài.

– Virus có vỏ bên ngoài: vỏ bên ngoài của virus dung hợp với màng sinh chất rồi đẩy nucleocapsid vào tế bào. Vỏ bên ngoài virus hòa với màng sinh chất mà không chui vào tế bào chất. Ví dụ: virus HIV, virus paramyxo, herpes.

– Màng tế bào lõm vào bao lấy virus tạo thể nội bào (endosom), Endosom dung hợp với lisosome. Bơm proton H^+ vào lisosome, tạo pH 5 – 5,5. Ở pH này, enzyme trong lisosome hoạt hóa phân giải vỏ capsid, giải phóng acid nucleic vào tế bào chất. Ví dụ adenovirus reovirus và influenza virus.

3.4.2.2. Cởi vỏ

Enzyme tiêu hóa của tế bào từ lysosome tiến hành phân giải vỏ protein của virus để giải phóng acid nucleic hoặc genome vào tế bào chất.

3.4.2.3. Phiên mã

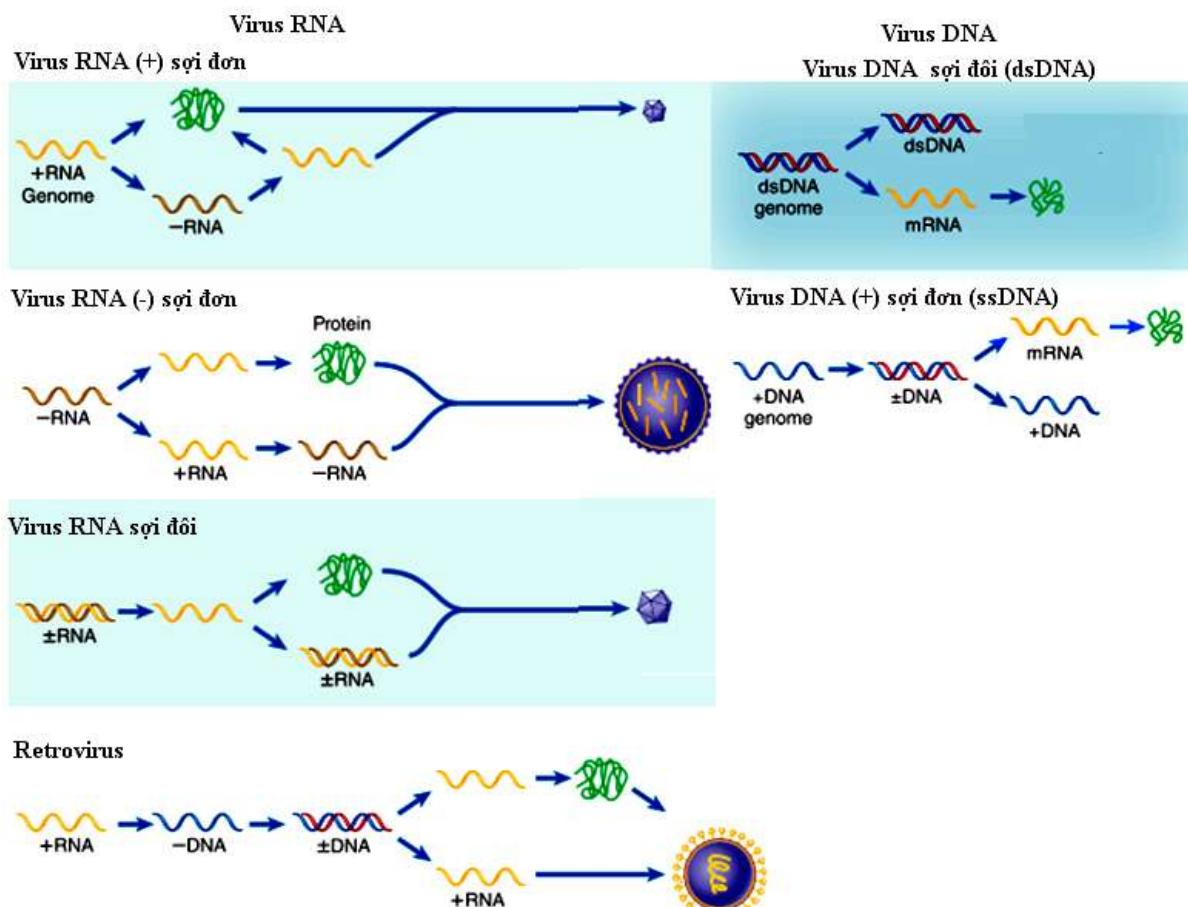
Tạo thành mRNA của virus hoặc phân tử dạng sao chép của genome.

3.4.3. Tổng hợp các thành phần của virus

3.4.3.1. Tổng hợp protein của virus

mRNA của virus được phiên mã trên ribosome của tế bào tạo ra hai loại protein:

- Protein cấu trúc là protein capsid, protein vỏ ngoài và protein trong lõi.
- Protein không cấu trúc là enzyme cần cho sao chép genome. Protein không cấu trúc tìm thấy trong hạt virus, trừ một số trường hợp đặc biệt ví dụ enzyme phiên mã ngược có trong virus HIV hoặc virus viêm gan B chứa DNA polymerase, một số virus RNA chứa RNA polymerase.



Hình 3.7. Các hình thức phiên mã và giải mã ở virus (Marjorie Kelly Cowan et al., 2014).

3.4.3.2. Tổng hợp acid nucleic của virus

– Genome của virus con được sao chép từ genome của virus mẹ. Trong trường hợp genome là mạch đơn thì khuôn là mạch bô sung mới tạo thành của genome mẹ.

– Phần lớn quá trình sao chép được thực hiện nhờ polymerase (replicase) do virus mã hóa. Đối với một số virus DNA thì quá trình tổng hợp được thực hiện nhờ enzyme của tế bào.

3.4.4. Lắp ráp

– Genome và protein mới được tạo thành lắp ráp với nhau tạo nên hạt virus mới. Đa số trường hợp protein capsid lắp ráp tạo thành cấu trúc rỗng gọi là tiền capsid (procapsid), sau đó do chuyển động brown, acid nucleic chui vào cấu trúc này rồi hàn kín lại.

– Lắp ráp có thể xảy ra trong nhân tế bào, trong tế bào chất hoặc ngay sát màng sinh chất (đối với đa số virus màng bao). Virus này chồi, màng sinh chất bao lấy nucleocapsid tạo vỏ ngoài.

3.4.5. Giải phóng

Virus có thể làm tan tế bào để được phóng thích ồ ạt ra ngoài hoặc đối với virus có vỏ ngoài thì phóng thích ra từ từ theo lối nảy chồi.

3.5. BACTERIOPHAGE

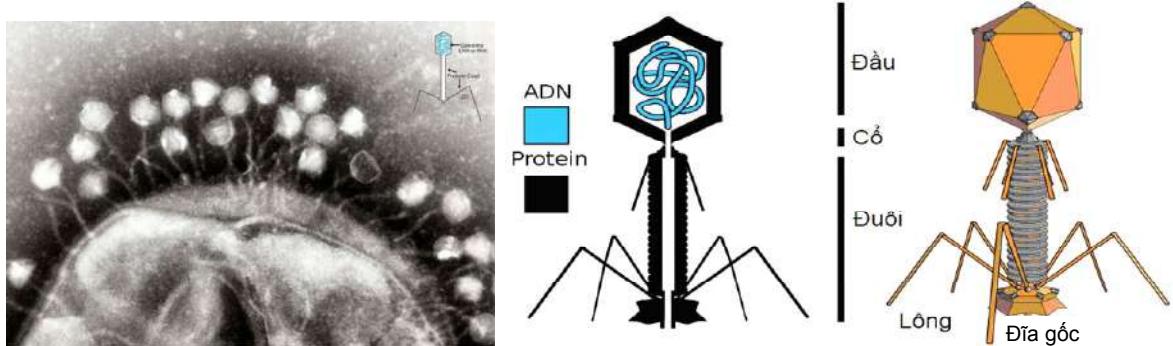
Bacteriophage là một loại virus đặc biệt, tên gọi tắt là phage hay còn được gọi là thế thực khuẩn. Đây là nhóm virus phân bố rộng rãi trong tự nhiên, lần đầu tiên được nhà khoa học người Anh Frederick Twort (1877 – 1950) phát hiện ở tụ cầu năm 1915, sau đó ông Felix d'Hérelle (1873 – 1949), nhà vi sinh học mang hai quốc tịch Pháp – Canada đã xác định được virus ký sinh trên vi khuẩn ly và gọi chúng là Bacteriophage. Hiện nay, người ta đã biết đến vài nghìn phage khác nhau, ví dụ: MS₂, f₂, Q β , ϕ ×174, T₃, T₇, T₂, T₄, T₆ vật chủ là *E. coli*; PM₂ – *Pseudomonas*...

Phage không gây bệnh cho người mà chỉ gây bệnh cho vi khuẩn. Mỗi vi khuẩn có thể là vật chủ của một hoặc nhiều phage. Hiện nay, phage được sử dụng để nghiên cứu định loại prokaryote, vận chuyển các yếu tố di truyền trong nghiên cứu sinh học phân tử, điều trị các bệnh do vi khuẩn, điều tra dịch tễ học...

3.5.1. Cấu trúc của phage

– Cấu trúc: phage có ba dạng cơ bản: cấu trúc hình khói không đuôi, cấu trúc hình khói có đuôi và cấu trúc dạng sợi hay dạng que. Dạng có đuôi (chẳng hạn phage T2 – hình 3.8) gồm đầu hình khói đa diện; cỗ; đuôi có dạng hình trụ gồm bao đuôi và ống trực, cuối đuôi có các sợi lông như chân để bám vào vi khuẩn và đĩa gốc với 6 sợi lông đuôi.

- Thành phần hóa học gồm:
 - + DNA: có hầu hết ở các phage, thường có hai chuỗi xoắn vào nhau, một số có DNA một chuỗi, những phage không chứa DNA thì chứa RNA và thường là RNA một chuỗi.
 - + Protein: vỏ capsid được cấu tạo bằng những đơn phân gọi là capsomer chính là những hạt protein.
 - + Enzyme: ở đuôi của phage có chứa một số loại enzyme.



**Hình 3.8. Ảnh hiển vi điện tử các phage bám trên bề mặt tế bào vi khuẩn (trái);
hình mặt cắt (giữa) và hình dạng ngoài phage T2 (Hershey và Chase, 1952).**

- *Phage độc*: phage sau khi nhân lên trong vi khuẩn thì vi khuẩn sẽ chết và phage mới hình thành.
 - *Phage ôn hòa*: sau khi xâm nhập vào tế bào vi khuẩn sẽ xảy ra một trong hai trường hợp:
 - + Theo cách nhân lên của phage độc và giết chết tế bào vi khuẩn.
 - + Các DNA của phage gắn vào DNA của vi khuẩn tạo prophage cho nên không có quá trình nhân lên. Khi vi khuẩn nhân lên thì các DNA của phage nhân lên theo.

- Tính miễn dịch của phage:

Phage cũng có tính kháng nguyên đặc hiệu cho từng loại. Các huyết thanh miễn dịch có thể trung hòa phage tương ứng. Khi phage hấp phụ vào thành tế bào vi khuẩn thì huyết thanh miễn dịch không còn tác dụng.

3.5.2. Sự nhân lên của phage độc trong vi khuẩn

Sự nhân lên của phage độc trong vi khuẩn thường diễn ra theo các giai đoạn sau:

- *Giai đoạn hấp phụ và xâm nhập*: Muốn xâm nhập và nhân lên trong vi khuẩn, trước hết phage phải tìm thấy chỗ tiếp nhận đặc hiệu trên bề mặt tế bào vi khuẩn. Nhiều nghiên cứu cho thấy khi vi khuẩn biến dị, thay đổi tính chất bề mặt thì phage không có khả năng xâm nhập vào vi khuẩn. Khi đã bám vào bề mặt tế bào vi khuẩn, lizozyme ở đuôi của phage sẽ làm tan vách (thành) tế bào vi khuẩn, sau đó đuôi co bóp đẩy lõi của đuôi vào

vi khuẩn, tiếp theo ADN của phage sẽ được bơm vào tế bào vi khuẩn. Vỏ capsid sẽ ở lại ngoài vi khuẩn.

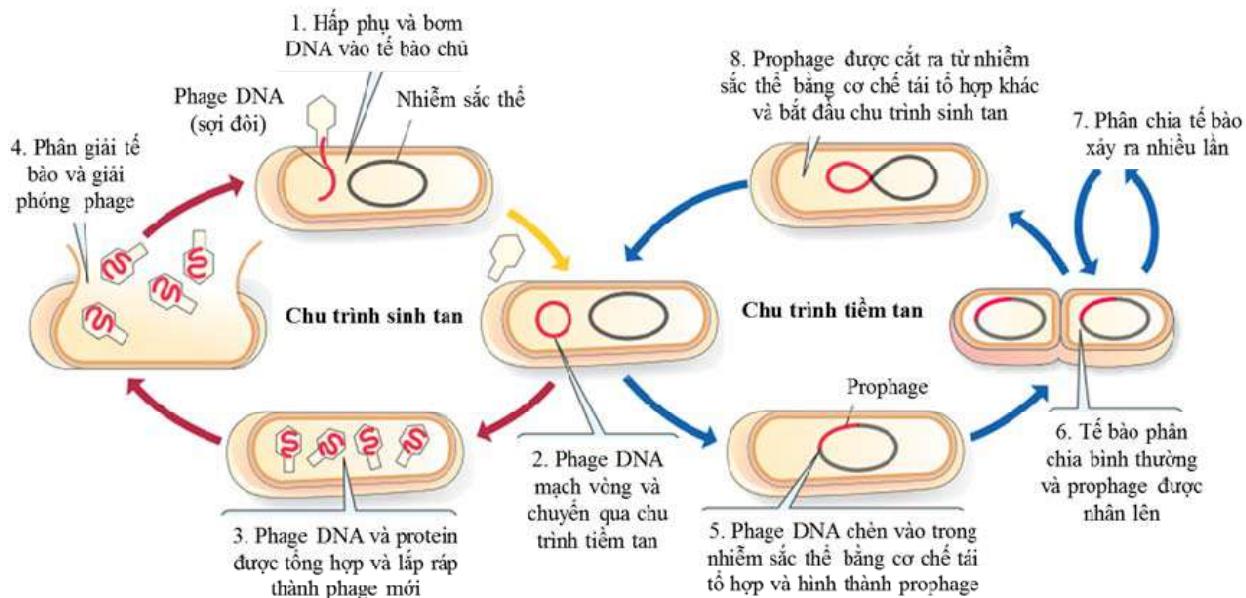
– *Giai đoạn sinh tổng hợp các thành phần:* Sau 2 – 3 phút, enzyme deoxyribonuclease của phage xuất hiện phá hủy DNA của tế bào vi khuẩn, mARN và kèm theo hàng loạt enzyme cần thiết cho phage được tổng hợp. DNA của phage được hình thành cùng với protein (tạo vỏ capsid) của phage được tổng hợp ở ribosome của tế bào chủ.

– *Giai đoạn lắp ghép và giải phóng:* Các thành phần DNA lắp ghép với protein tạo thành phage. Các phage mới được hình thành sau thời gian khoảng 12 phút và sự giải phóng phage mới thường xảy ra ở phút thứ 25. Trung bình mỗi vi khuẩn có thể giải phóng từ 100 đến vài trăm phage.

3.5.3. Tính tiềm tan và phage lambda (λ)

Quá trình tan và tiềm tan chỉ dành cho bacteriophage (phage) lần đầu tiên được phát hiện ở vi khuẩn *E. coli* K12/phage λ .

Sau khi phage λ xâm nhập vào tế bào vi khuẩn chủ (*E. coli* K12), chúng gắn phân tử DNA vào NST của vi khuẩn và tiến hành sao chép như một phần của NST vi khuẩn. Các hạt phage không được tạo thành. Phân tử DNA của phage khi gắn vào bộ gene của vi khuẩn được gọi là prophage. Tế bào vi khuẩn mang prophage được gọi là tế bào tiềm tan (lysogen). Khi có tác nhân gây đột biến (ví dụ như tia UV) tác động vào prophage, lập tức chúng chuyển sang dạng gây độc và thực hiện chu trình sinh tan. Mỗi quan hệ này được hiểu theo sơ đồ sau (hình 3.9):



Hình 3.9. Chu trình tan và tiềm tan ở phage λ (Jeffrey et al., 2011).

– Chu trình tan

- (1) Phage tấn công tế bào chủ và bơm DNA vào;
- (2) Tái tạo vòng DNA phage;
- (3) DNA và protein của phage được tổng hợp và lắp ghép tạo thành phage mới;
- (4) Tế bào bị phân giải, giải phóng phage.

– Chu trình tiềm tan

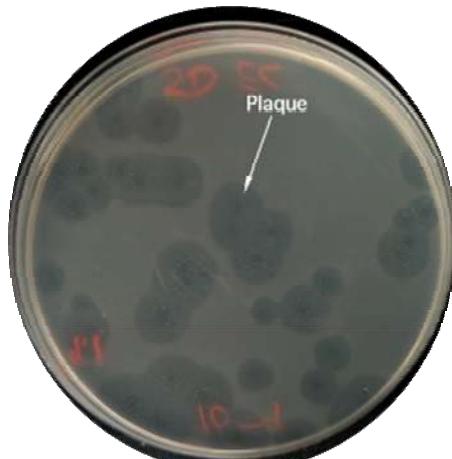
- (1) DNA của phage tích hợp vào NST vi khuẩn tạo thành dạng prophage;
- (2) Tế bào vi khuẩn phân chia bình thường, sao chép prophage và truyền cho thế hệ sau;
- (3) Nhiều tế bào phân chia tạo ra khuẩn lạc vi khuẩn có chứa prophage;
- (4) Một số prophage tồn tại trên NST vi khuẩn khởi đầu cho chu trình sinh tan mới.

Khi tách ra chúng có thể đếm theo một số gene liền kề ở NST. Nếu các gene này mã hóa cho một tính trạng nào đó thì tế bào mới cũng mang tính trạng đó. Việc truyền vật liệu di truyền từ tế bào này sang tế bào khác nhờ virus gọi là tải nạp.

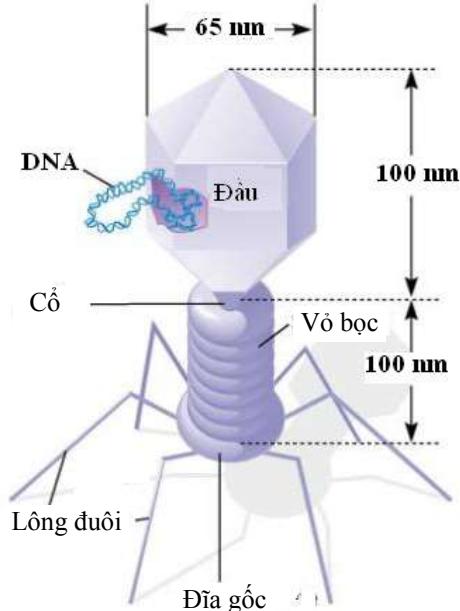
Prophage chứa gene mã hóa protein ức chế quá trình tan. Nếu gene này bắt hoạt chất ức chế không được tạo thành thì sẽ tiến hành chu trình sinh tan.

3.5.4. Phương pháp khảo sát phage

3.5.4.1. Sự hình thành vệt tan



Vệt tan



Phage lambda

Hình 3.10. Vệt tan – “plaque” của phage λ đối với vi khuẩn E. coli.

“Plaque” vệt tan: phage chỉ nhân lên ở tế bào vi khuẩn sống nhạy cảm. Vì kích thước không cho phép quan sát trực tiếp nếu không có kính hiển vi điện tử nên chúng ta chỉ theo dõi hoạt động của chúng bằng phương tiện gián tiếp. Thông thường người ta cho một hạt phage vào một lớp vi khuẩn đang phân chia ở trên đĩa thạch dinh dưỡng sẽ tạo nên một vùng phân giải sáng mờ đục của vi khuẩn đang phát triển (hình 3.10). Vùng phân giải này gọi là một vệt tan hay còn gọi là đóm tan – “plaque”; nó được tạo thành do tế bào vi khuẩn bị nhiễm phage phân giải và phóng thích nhiều hạt phage mới, những phage này liền xâm nhiễm những tế bào vi khuẩn kế cận. Quá trình này lặp lại tuần tự cho đến khi sự phát triển của vi khuẩn ở trên đĩa thạch ngừng lại do hết thức ăn và tích tụ phẩm vật độc. Nếu thao tác khéo léo mỗi hạt phage tạo nên một plaque. Mọi vật liệu chứa phage có thể định lượng như thế bằng cách pha loãng thích hợp và cho vào đĩa thạch dinh dưỡng mọc dày đặc vi khuẩn nhạy cảm. Đếm plaque (PFU – Plaque forming unit) cũng tương tự như đếm khuẩn lạc (CFU) trong định lượng vi khuẩn.

3.5.4.2. Phân lập và tinh chế

Để khảo sát những tính chất vật lý và hóa học của phage, cần phải điều chế một lượng đầy đủ phage tinh chế không chứa vật liệu tế bào. Thông thường người dùng môi trường lỏng nuôi cấy vi khuẩn vật chủ được tiếp chủng phage và ủ cho đến khi môi trường nuôi cấy chứa các vi khuẩn mẫn cảm hoàn toàn ly giải. Lúc này dịch thủy phân chỉ chứa hạt phage và mảnh vụn vi khuẩn, chúng được tách riêng bằng ly tâm phân biệt. Phần phage ly tâm có thể sử dụng để khảo sát những tính chất vật lý và hóa học hoặc soi kính hiển vi điện tử.

3.5.5. Ứng dụng của phage

– *Ứng dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử:* nhiều phage được dùng làm phương tiện chuyển gene trong nghiên cứu sinh học phân tử và di truyền vi khuẩn. Sự tái nạp là quá trình vận chuyển gene ở vi khuẩn qua trung gian của phage. Một vài chủng phage ví dụ phage P₂₂ có thể vận chuyển bất cứ gene nào của vi khuẩn, đó là sự chuyển nạp tổng quát. Trong sự chuyển nạp đặc hiệu, một số phage đặc hiệu, ví dụ phage λ (lambda) chỉ vận chuyển một số gene của vi khuẩn cho sang vi khuẩn nhận.

– *Phòng và điều trị bệnh do vi khuẩn:* trong một số bệnh do vi khuẩn gây ra, ví dụ như bệnh lỵ, người ta đã cho bệnh nhân uống phage đặc hiệu của vi khuẩn có nguy cơ gây bệnh hoặc đang gây bệnh để phòng và điều trị. Hiện nay, nhiều công ty dược phẩm của Mỹ, Ấn Độ... đang nghiên cứu phage để điều trị nhiều căn bệnh vi khuẩn như: lao, vi khuẩn gây nhiễm độc thức ăn, cùng những vũ khí sinh học, trong đó có bệnh than. Phương pháp này có hiệu quả cao nhưng khó thực hiện và tốn kém.

– *Chẩn đoán và phân loại vi khuẩn:* Phage ký sinh đặc hiệu đối với vi khuẩn. Trong chẩn đoán và phân loại một số vi khuẩn như tụ cầu, vi khuẩn lam..., người ta dùng phage

đã biết tên trước cho tiếp xúc với vi khuẩn đang cần xác định, nếu đặc hiệu (cùng tên) thì tế bào vi khuẩn sẽ bị phage gây bệnh và làm tan tế bào đó. Đây là cách chẩn đoán, phân loại nhanh và đặc hiệu cao.

– *Phát hiện phóng xạ:* Những tế bào vi khuẩn tiêm tan thường bị phân giải khi có tác dụng của chất phóng xạ, bởi vậy người ta dùng những tế bào tiêm tan đó cho tiếp xúc với môi trường hoặc những chất nghi bị nhiễm phóng xạ, nếu tế bào vi khuẩn bị phân giải có nghĩa là môi trường hoặc những chất đó đã nhiễm phóng xạ.

3.6. CÁC BỆNH DO VIRUS

Virus là tác nhân gây bệnh quan trọng cho người, động vật, cây trồng và vi sinh vật. Đa số các bệnh thường gặp ở người là do virus. Hầu hết chúng gây bệnh ở thể nhẹ, bệnh nhân tự bình phục sau một thời gian nhất định. Nhiều loại tồn tại thầm lặng trong cơ thể. Chúng nhân lên nhưng không gây bất kỳ triệu chứng nào. Tuy nhiên, việc nhiễm virus thường ở thể nhẹ, mặc dù đôi khi có thể gây bệnh trầm trọng ở những người mẫn cảm bất thường. Một số do virus gây bệnh rất nặng và thường có tỷ lệ tử vong cao. Sau đây là một số virus gây bệnh (bảng 3.2, 3.3).

Bảng 3.2. Virus gây bệnh chứa genome DNA

Nhóm virus	Tên virus	Tên bệnh
Pox	Variola Molluscum (u mềm)	Đậu mùa U mềm lây
Herpes	Herpes simplex Varicella zoster Cytomegalo EB (Epstein – Barr), HH6	Herpes Thủy đậu zona (shingles) Nhiễm trong thỏa hiệp miễn dịch Bệnh bạch cầu đơn nhân lây nhiễm Bệnh ngoại ban đột ngột
Adeno	Virus adeno	Viêm họng Viêm kết mạc
Hepadna	Viêm gan B	Viêm gan
Papova	Papiloma Virus JC	Mụn cóc Viêm chất trắng não nhiều ổ tiến triển
Parvo	B19	Ban đỏ truyền nhiễm, cơn bất sản

Bảng 3.3. Virus gây bệnh chứa genome RNA

Nhóm virus	Tên virus	Tên bệnh
Orthomyxo	Virus cúm	Cúm
Paramyxo	Á cúm; Hợp bào hô hấp Sởi Quai bị	Viêm nhiễm đường hô hấp Sởi Quai bị
Corona	Virus corona	Gây nhiễm đường hô hấp SARS
Rhabdo	Virus dại	Bệnh dại
Picorna	Enterovirus Rhino Viêm gan A	Viêm não, bại liệt Cảm lạnh Viêm gan
Calici	SRSV (virus có cấu trúc dạng tròn nhỏ – small round structure virus)	Viêm dạ dày, ruột
Toga	Alpha (virus arbo nhóm A) Rubi	Viêm não Sốt xuất huyết Rubeon (sởi Đức)
Flavi	Flavi (virus arbo nhóm B) Viêm gan C	Viêm não Sốt xuất huyết Viêm gan
Bunya	Một số virus arbo	Viêm não Sốt xuất huyết Sốt, viêm thận
Reo	Rota	Bệnh đường tiêu hóa
Arena	Viêm màng não đám rối màng mạch lympho bào Virus Machupo; Virus Junin Virus Lassa	Viêm màng não Sốt xuất huyết
Retro	HTLV – I, II	Ung thư tế bào T U lympho; Liệt
	HIV – 1, 2	AIDS
Filo	Virus Marburg Virus Ebola	Sốt Marburg Sốt xuất huyết Ebola

3.7. ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC TÁC NHÂN VẬT LÝ, HÓA HỌC ĐẾN VIRUS

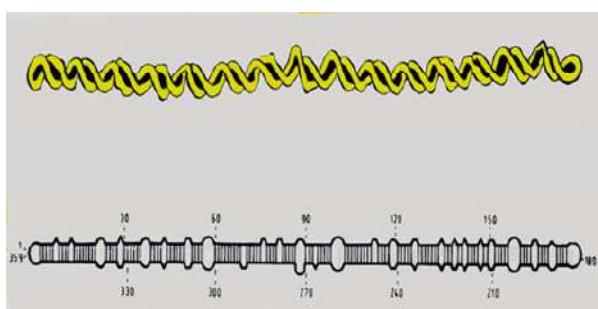
- Nhiệt độ cao: Đa số virus bị bất hoạt ở 56°C trong vòng 30 phút, hoặc ở 100°C trong vài giây.
- Nhiệt độ thấp: Đa số virus bền ở nhiệt độ lạnh nên có thể bảo quản lâu ở âm 70°C . Một số virus bị bất hoạt trong quá trình làm đông lạnh hoặc tan băng.
- Khô hạn: Khả năng chịu khô hạn của virus khác nhau tùy loài. Một số sống sót, một số bị bất hoạt nhanh ở điều kiện khô hạn.
- Bức xạ tử ngoại: Virus bị bất hoạt bởi tia tử ngoại.
- Chloroform, ether và các dung môi khác: Các virus có vỏ ngoài chứa lipid sẽ bị bất hoạt, còn không chứa lipid sẽ bền vững.
- Các chất oxy hóa và chất khử: Virus bị bất hoạt bởi dưới tác dụng của formaldehyde, chlor, iod và H_2O_2 . β -Propiolactone và formaldehyde là các hóa chất được dùng để bất hoạt virus trong sản xuất vaccine, song đa số virus không bị bất hoạt bởi phenol.
- Chất khử trùng virus: Tốt nhất là dùng dung dịch hypochloruria (một chất ăn mòn) và glutaraldehyde (là chất có thể gây mẫn cảm và kích thích gây khó chịu chảy nước mắt cho người dùng).

3.8. CÁC THỰC THỂ DƯỚI VIRUS

Các thực thể dưới virus hiện được nghiên cứu là viroid và prion.

3.8.1. Viroid

Các viroid là các thực thể dưới virus với các phân tử RNA cảm nhiễm, mạch vòng, sợi đơn dài từ 250 đến 400 ribonucleotide được phát hiện năm 1971. Chúng có khả năng nhân đôi trong tế bào chủ và truyền từ vật chủ này đến vật chủ khác thông qua các phương tiện cơ học, các vùng tồn thương hay truyền qua các hạt phấn và noãn bị nhiễm. Viroid là tác nhân gây bệnh nhỏ nhất mà con người đã biết (bệnh củ khoai tây hình thoi, bệnh lùn ở thực vật, bệnh hại cây dừa...). Viroid không có vỏ capsid và thậm chí không mã hóa bất kỳ protein nào và sự nhân lên của chúng phụ thuộc hoàn toàn vào sự hoạt động của enzyme tế bào chủ (hình 3.11).



(a)



(b)

Hình 3.11. a. Phân tử viroid; b. Củ khoai tây bị bệnh có dạng hình thoi.

3.8.2. Prion

Chỉ chứa thành phần protein và không chứa một loại acid nucleic nào. Trong cơ thể bình thường có thể có sẵn các prion nhưng chúng không gây bệnh. Trong điều kiện nào đó, prion có thể thay đổi cấu trúc và gây bệnh.

Prion gây nhiều bệnh nguy hiểm ở động vật và người, gây thoái hóa hệ thần kinh trung ương và giảm sút trí tuệ như bệnh BSE (xốp não – bò điên)...

Năm 1981, Stanley B. Prusiner chứng minh nguyên nhân gây ra căn bệnh trên có bản chất là protein và được gọi là prion, có nghĩa là protein gây nhiễm. Ông là người đầu tiên phân lập được prion và nhờ công trình này ông nhận giải Nobel Y học năm 1997.

3.8.2.1. Khái quát về prion

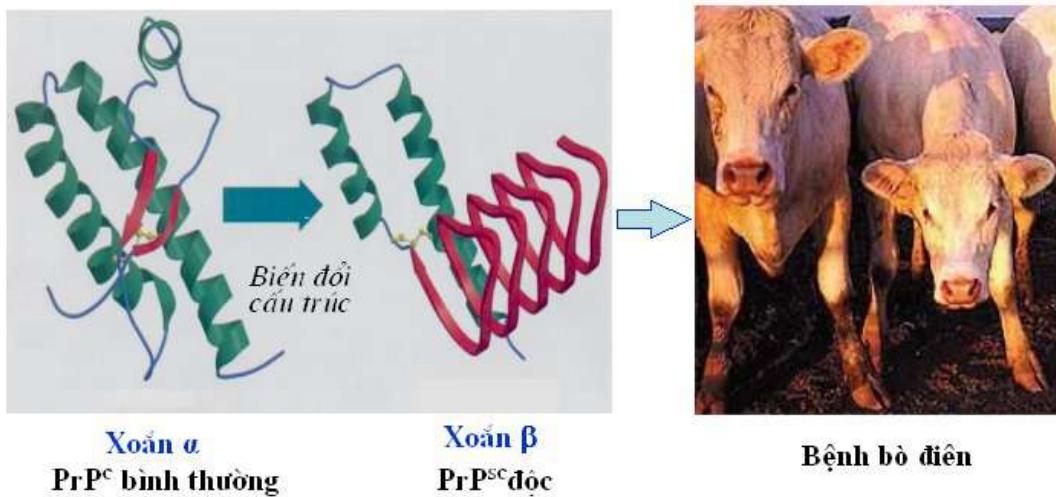
Protein prion, viết tắt là PrP, là sản phẩm bình thường của gene protein prion, gọi tắt là PRNP (normal product of prion gene) được biểu hiện ở hầu hết các động vật có vú, đặc biệt được biểu hiện mức cao trong các tế bào mô não.

Có hai loại PrP: loại bình thường không gây bệnh của tế bào được ký hiệu là PrP^c (c-cell) và loại gây bệnh được ký hiệu là PrP^{Sc} (sc-scrapie). PrP^{Sc} có khối lượng phân tử 27.000 – 30.000 Da nên gọi là Pr27-30. Còn các thuật ngữ khác để chỉ prion có cấu trúc khác với PrP^c và PrP^{Sc}, ví dụ khi PrP bị cắt mất đầu và đuôi hoặc ở dạng tổ hợp của hai loại trên, đó là PrP^{res} và PrP^{sens}. Chữ res (resistance) thể hiện tính kháng lại sự phân giải của protease còn chữ sens (sensitivity) thể hiện tính mẫn cảm với enzyme này (bảng 3.4).

Bảng 3.4. So sánh PrP^c và PrP^{Sc}

Đặc điểm	PrP ^c	PrP ^{Sc}
Cấu trúc	Dạng cầu	Dạng kéo dài
Kháng protease	Có	Không
Có mặt trong sợi Scrapie	Có	Không
Nằm trong hoặc trên tế bào	Trong bọng sinh chất	Trên màng sinh chất
Thời gian quay vòng (chu kỳ)	Nhiều ngày	Nhiều giờ

PrP^c có cấu trúc bậc hai chủ yếu là dạng xoắn α (thường có ba chuỗi như vậy) còn PrP^{Sc} chủ yếu có cấu trúc phiến gấp nếp β. PrP^c có thể gây nhiễm từ cá thể này sang cá thể khác. Khi ở trong cơ thể nó có thể biến đổi cấu trúc bậc hai PrP^c → PrP^{Sc} và gây bệnh (hình 3.12).



Hình 3.12. Prion và cơ chế gây bệnh BSE (xốp não – bò điên).

Các đột biến làm thay đổi cấu hình PrP^c làm cho nó ngẫu nhiên trở thành PrP^{Sc}. Đặc biệt một số đột biến sẽ biến đổi PrP^c xung quanh thành PrP^{Sc}.

Có trường hợp biến đổi PrP^c thành PrP^{Sc} một cách tình cờ mà không cần có đột biến. Điều này có thể lý giải vì sao bệnh prion có thể là do lây nhiễm, do di truyền hay xuất hiện một cách tình cờ.

Đặc điểm đặc trưng nhất của prion là vẫn giữ được khả năng gây bệnh sau khi bị chiếu tia phóng xạ, UV, dưới tác dụng của hơi dung dịch 70% ethanol và formaldehyde.

Prion có thể chui qua màng lọc cỡ 0,1 µm (màng lọc vi khuẩn là 2,2 µm), chỉ bị bắt hoạt với dung dịch NaOH 1 M ở 55 °C hay chất tẩy rửa 20.000 ppm (nồng độ bột giặt gia đình thường là 5.000 ppm).

3.8.2.2. Cấu trúc của prion

PrP^c là một protein gồm 4 chuỗi ký hiệu là H₁, H₂, H₃ và H₄ chứa khoảng 40% chuỗi α và 45% dài gấp β.

Vùng đầu -NH₂ của PrP^c tạo ra bề mặt chung nối với PrP^{Sc}. Đầu -NH₂ rất linh động, cấu trúc bậc ba của đầu -NH₂ liên quan đến sự thay đổi cấu trúc trong quá trình hình thành PrP^{Sc}.

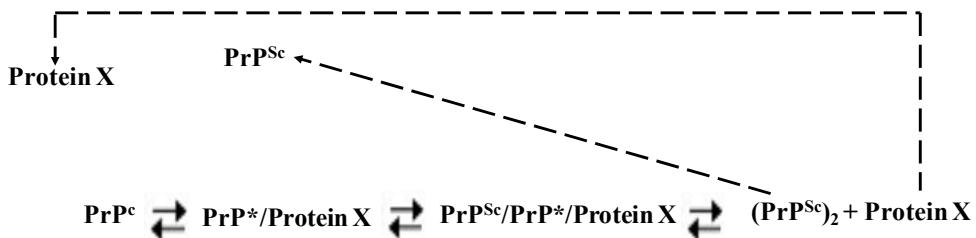
Vùng ở đầu -COOH của PrP^c là vị trí gắn với protein.

PrP^{Sc} được tạo thành do sự tháo xoắn ở đầu -NH₂ của PrP^c tạo thành dải gấp nếp β. Giải gấp nếp này nhiều (45%) nên cấu trúc ổn định hơn so với PrP^c, ngăn cản sự phân giải của protein. PrP^{Sc} gây bệnh ở dạng dimer.

Bước đầu PrP^c kết hợp với protein X để tạo thành phức hợp PrP*/Protein. Tiếp đến là PrP^c liên kết PrP trong phức hợp PrP*/Protein. Khi PrP* được chuyển dạng thành phân tử mới, protein X sẽ rời khỏi phức hệ, chỉ còn lại dạng dimer (hoặc oligomer).

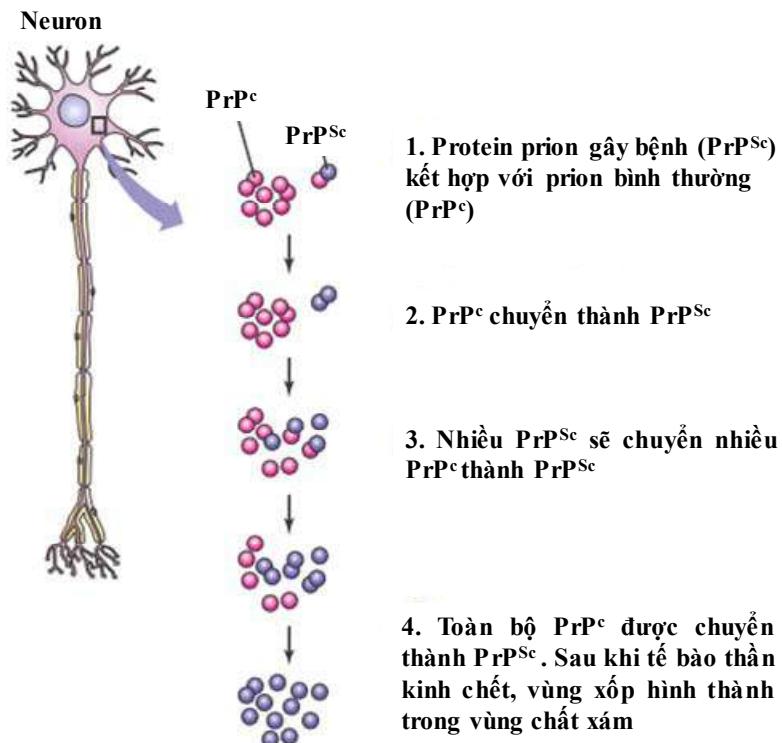
3.8.2.3. Sự nhân lên của prion

Trong các tế bào không bị nhiễm PrP^c với trình tự kiểu dạng WT (wild type) tồn tại trong trạng thái cân bằng dạng monomer xoắn α , mẫn cảm với protease hoặc gắn với protein X (hình 3.13).



Hình 3.13. Sơ đồ sự tạo thành PrP^c nhờ khuôn có sẵn.

Trong cơ thể bình thường, prion được tạo thành bởi tế bào thần kinh và một số tế bào nhất định. Việc tạo ra PrP^c bắt đầu từ nhân, mRNA dùng để dịch mã cho PrP^c được tạo thành trong nhân, xuyên qua lỗ màng nhân ra tế bào chất gắn vào ribosome tạo phức đính vào màng lưới nội chất hạt (RER – rough endoplasmid reticulum), sau đó PrP^c được tổng hợp và vận chuyển thông qua bộ máy Golgi. Ở phía đỉnh bộ máy này, các bọng (kiểu không bào) chứa PrP^c này chồi và vận chuyển đến bề mặt tế bào. Ở đây chúng dung hợp với màng sinh chất và phân tử hình que chui ra ngoài tế bào.



Hình 3.14. Sự nhân lên của prion (Jeffrey et al., 2011).

Trình tự amino acid của protein prion PrP^c và prion PrP^{Sc} là như nhau nhưng cấu hình không gian thì khác nhau. PrP^c chủ yếu ở dạng α còn PrP^{Sc} chủ yếu là dạng dài β . Chúng nhân lên ở gian bào mô thần kinh, chèn ép làm tế bào thần kinh não bị hoại tử tạo các hố nêu gọi là bệnh xốp não.

Prion có thể đi vào não dọc theo sợi trực (axon) của tế bào thần kinh. Prion có thể nhân lên trong tế bào lympho, do đó di chuyển được trong máu. Chúng có thể nhân lên trong các tế bào sao (aster) và các tế bào thần kinh đệm khác.

Sau khi ăn phải thức ăn nhiễm prion, chúng được tế bào lympho hấp thụ rồi đi vào các mô bạch huyết, mảng payer, amidan. Tại đây có các dây thần kinh qua đó prion có thể xâm nhập vào hệ thần kinh trung ương. Các PrP^{Sc} bám vào các PrP^c liền gây nên thay đổi cấu hình của PrP^c tạo nên các PrP^{Sc} là nguyên nhân gây chết tế bào thần kinh (hình 3.14).

3.8.2.4. Nghiên cứu biện pháp chống bệnh prion

Hiện nay khoa học đang đưa ra các phương án thiết kế các loại thuốc nhằm ngăn cản sự tạo thành prion gây bệnh từ prion bình thường:

- Tạo được phầm có cấu trúc giống như protein X để cạnh tranh gắn vào PrP^c làm ổn định cấu trúc của PrP^c và không cho nó chuyển hóa thành PrP^{Sc}.
- Tìm kháng thể gắn vào PrP^c.

Bảng 3.5. So sánh giữa virus và prion

Đặc điểm	Virus	Prion
Qua được màng lọc vi khuẩn	Có	Có
Chứa acid nucleic	Có	Không hoặc rất ít (~ 50 nucleotide không đủ mã hóa cho bất kỳ protein nào của prion)
Có hình dạng đặc trưng dưới kính hiển vi điện tử	Có	Không
Chứa protein	Có	Có
Bị bất hoạt bởi:		
+ Formaldehyde	Có	Không
+ Protease	Ít	Không
+ Nhiệt độ (80°C)	Phần lớn	Không
+ Ion hóa và tia UV	Ít	Không
Bệnh lý:		
+ Thời gian ủ bệnh	Tùy thuộc loại virus	Dài
+ Phản ứng miễn dịch	Có	Không
+ Tạo interferon	Có	Không
+ Gây phản ứng viêm	Có	Không

- Tạo ra các chất hóa học có thể chuyển PrP^c thành PrP^{Sc}. Một số chất có hoạt tính này như dimethylsulfocide, oxid trimethylamine N, một số polyol khác và một số loại đường.
- Ngăn cản sự tạo thành PrP^{Sc} nhờ acid nucleic.
- Sử dụng các hợp chất, ví dụ chất dẫn xuất của 1,2-hydroquinone sẽ bảo vệ tế bào khỏi bị phá hủy.
- Tạo ra các động vật chuyên gene không mang gene PrP, do đó có thể kháng được bệnh prion.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Virus là những thực thể gây nhiễm chua có cấu tạo tế bào, có thể chui qua màng lọc vi khuẩn, có khả năng gây bệnh cho người, động vật và thực vật. Virus có thành phần chính là lõi acid nucleic nằm ở giữa hạt virus, mỗi loại virus chỉ chứa một trong hai loại acid nucleic là DNA hoặc RNA, bao quanh lõi acid nucleic là lớp protein capsid. Sự tập hợp của những lớp protein này quyết định hình dạng virus. Một số virus ở dạng trần hay có thêm màng bao ngoài.

Do virus có đời sống ký sinh bắt buộc nên phải nuôi cấy virus trên các tế bào hay tổ chức sống.

Quá trình nhân lên của virus độc thường gồm năm giai đoạn: giai đoạn hấp phụ, giai đoạn xâm nhập, giai đoạn tổng hợp các thành phần của virus, giai đoạn lắp ráp hạt virus mới và giai đoạn giải phóng virus ra khỏi tế bào để tiếp tục xâm nhập vào các tế bào lành.

Các thực thể dưới virus (viroid, prion) mới được phát hiện gần đây, chúng gây nhiều bệnh đặc hiệu cho người, động vật (prion), thực vật (viroid).

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Đặc điểm hình dạng và cấu tạo của virus?
2. Các giai đoạn nhân lên của virus?
3. Những sai khác cơ bản giữa virus trần và virus có màng bao ngoài?
4. Các đặc điểm chính của virion, viroid và prion?
5. Trình bày các phương thức xâm nhập của virus vào tế bào chủ.
* Chọn đáp án đúng nhất
6. Sự sai khác nhau về thành phần cấu tạo giữa virus cùm và virus khâm thuốc lá:
 - a. Vật chất di truyền là RNA.
 - b. Vỏ capsid được cấu tạo từ các đơn vị hình thái (*capsome*).

- c. Có màng bọc bên ngoài vỏ capsid, có lông dính kết hòng cùu.
d. Có cấu trúc đối xứng hình trụ xoắn.
7. Đặc điểm đặc trưng của prophage?
a. Có thể chuyển từ tế bào này sang tế bào khác nhờ quá trình tiếp hợp, biến nạp hay tái nạp.
b. Không có vỏ protein bao bọc.
c. DNA có khả năng nhân lên.
d. Không tồn tại ngoài tế bào.
8. So sánh một số đặc điểm Có (+)/Không (-) của virus với một số loại VSV khác:

Đối tượng so sánh	Nuôi cấy được trên MT nhân tạo	Có ribosomes	Phân đôi	Có DNA và RNA	Ký sinh mức độ
Virus					
Mycoplasma					
Rickettsia					
Clamydia					

** Điền vào các chỗ trống*

9. Ở một số virus, lớp vỏ bọc được phủ bởi các.....(a).... có bản chất là.....(b).....hoặc....(c).....mà vai trò của chúng là để nhận biết (về mặt hóa học) các...(d).... và gắn vào tế bào mà chúng gây nhiễm.
10. Các hạt tương tự virus song chỉ chứa ARN thuần khiết được gọi là....(a)....là loại gây bệnh ở thực vật có nghĩa kinh tế như....(b).....
11. Các hạt protein thuần khiết gây bệnh thần kinh ở động vật có tên là.....
12. Các bacteriophage được nhân lên trong...(a).... và làm tan nó, đó là quá trình....(b)...., tuy nhiên cũng có những phage không làm tan ngay tế bào, genome của phage xen vào genome tế bào và biến tế bào thành....(c).....
13. a. Virus phát triển bằng cách.....
b. Trong quá trình nhân lên của virus.....là có vai trò quyết định.
c. Virus nhân lên bằng cách dùng.....của tế bào.
d. Cấu tạo của virus gồm hai thành phần chính là.....

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. **Capsid:** Vỏ protein của virus.
2. **Capsomer:** Đơn vị hình thái cấu tạo nên vỏ capsid của virus.
3. **Dalton (ký hiệu Da):** Đơn vị đo khối lượng tương đương khối lượng nguyên tử hydro ($1,66 \times 10^{-24}$).
4. **Envelope (vỏ ngoài):** Vỏ bao quanh capsid, có nguồn gốc từ màng sinh chất hoặc màng nhân.
5. **Genom:** Bộ gene của một cơ thể.
6. **Plaque:** Vết tan.
7. **PFU:** (PFU – Plaque forming unit): Đơn vị hình thành vết tan.
8. **Prophage:** Genom của phage cài xen vào nhiễm sắc thể của tế bào vi khuẩn.
9. **Prion** là những phân tử protein và không chứa một loại acid nucleic nào. Khi cô lập protein này, người ta thu được cấu hình căn bản của nó là một dây protein gồm 263 amino acid.
10. **SARS** (severve acute respiratory syndrome): Hội chứng viêm đường hô hấp cấp nặng.
11. **Tiềm tan** (lysogeny) là một pha (phase) trong chu kỳ nhân lên của virus. Pha này bổ sung với pha tan (lytic phase), xảy ra sau khi gene của virus gắn vào NST của tế bào.
12. **Thực khuẩn thể** (bacteriophage hay phage) được dùng để chỉ các virus ký sinh sinh vật nhân sơ (vi khuẩn hoặc vi khuẩn cổ).
13. **Viroid** là những phân tử RNA khép vòng cỡ 150 ribonucleotit, ở dạng tròn không có vỏ capsid được phát hiện năm 1971.
14. **Virion** là virus ở trạng thái không hoạt động.

Chương 4

SINH LÝ HỌC VI SINH VẬT

Mục tiêu

- Nắm được nhu cầu của các chất dinh dưỡng đối với vi sinh vật.
- Hiểu được các chất dinh dưỡng, các kiểu dinh dưỡng và cơ chế hoạt động của các nhóm vi sinh vật.
- Phân biệt được các nhóm vi sinh vật theo các nguồn dinh dưỡng khác nhau.
- Vận dụng được lý thuyết sinh sản và phát triển của vi sinh vật vào thực tiễn bảo vệ môi trường.
- Nắm chắc các kiểu hô hấp, sự chuyển hóa các chất và các quá trình lên men ở vi sinh vật.

4.1. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA VI SINH VẬT

Nhìn chung thành phần tế bào VSV cũng gồm những hợp chất tương tự thành phần sinh vật bậc cao. Nó thay đổi tùy từng loài, tùy tuổi và môi trường dinh dưỡng.

Thường người ta chia các hợp chất trong tế bào làm hai loại: phần nước và phần khô gồm: protein, carbohydrate, lipid, các nguyên tố khoáng và một số chất hoạt động sinh học.

4.1.1. Nước

Nước có tỷ lệ lớn trong tế bào vi khuẩn, chiếm từ 75 – 85% trọng lượng nguyên sinh chất; chất khô chỉ chiếm 15 – 25%.

Trong tế bào vi sinh vật, phần lớn nước ở dạng tự do, có tác dụng hòa tan các chất vô cơ và hữu cơ. Thành phần nước tự do trong tế bào có thể thay đổi tùy theo điều kiện môi trường bên ngoài, trạng thái tế bào và lứa tuổi. Sự mất nước tự do làm rối loạn sự trao đổi chất.

Ngoài nước tự do còn một phần nước ở dạng liên kết với các hợp chất thê keo của tế bào bằng hấp phụ hoặc nối hóa học, ta gọi là nước cấu tạo. Nước cấu tạo khó tách khỏi tế bào và khi mất thì làm vỡ cấu tạo tế bào, tế bào sẽ bị chết.

4.1.2. Protein

Protein là thành phần chủ yếu của phần khô trong tế bào vi sinh vật, thường chiếm 80% trọng lượng khô. Tuy nhiên, thành phần protein cao không phải là đặc điểm của tất cả tế bào VSV. Một số VSV chỉ có 13 – 14% protein. Sự chênh lệch này là do chỉ một phần protein trong tế bào là protein cấu tạo có vai trò cơ bản trong quá trình sống, ngoài ra là

những protein dự trữ. Lượng protein dự trữ này nhiều hay ít tùy thuộc nhiều điều kiện, đặc biệt là thành phần thức ăn.

Protein đơn giản trong VSV bao gồm 3 loại: albumin, globulin và glutelin. Protein phức tạp là lipoprotein và nucleoprotein, ở nhiều VSV nucleoprotein chiếm từ 1/3 – 1/2 tổng số protein.

4.1.3. Carbohydrate

Carbohydrate chiếm khoảng 10 – 30% chất khô, ở nấm thành phần này đến 40 – 60%. Trong số đó thì 2 – 5% là ribose (trong thành phần acid nucleic), còn phần lớn là những polysaccharide thường gặp: hemicellulose, glycogen, glicerol, destran... Carbohydrate có giá trị lớn trong tế bào VSV, nó được dùng để tổng hợp protein và lipid, để làm vật liệu xây dựng tế bào và vật liệu năng lượng trong quá trình hô hấp.

4.1.4. Lipid và các chất tương tự (lipoid)

Lipid trong VSV rất phụ thuộc vào thành phần môi trường thức ăn, đa số VSV chứa từ 1 – 3% lipid, nhưng một số dạng vi khuẩn trong môi trường nhiều carbohydrate, ít hợp chất có nitơ thì lượng lipid có thể lên tới 50%. Chất béo trong tế bào có thể ở dạng tự do hoặc dạng kết hợp. Chất béo tự do được sử dụng làm vật liệu năng lượng và chất dự trữ.

4.1.5. Một số chất hữu cơ có hoạt tính sinh học

Thường chúng chỉ chiếm một tỷ lệ trọng lượng rất nhỏ, nhưng chúng rất quan trọng. Đáng chú ý nhất là các enzyme, vitamin, sắc tố, một số acid hữu cơ, độc tố, chất kháng sinh có tác dụng quan trọng trong quá trình trao đổi chất. Các chất sinh trưởng thường bao gồm các vitamin và một số amino acid đặc biệt. Các sắc tố cũng thường gặp ở VSV, chính nó mang lại cho VSV có màu sắc. Một số sắc tố đóng vai trò rất quan trọng trong sự đồng hóa khí CO₂.

4.1.6. Các nguyên tố khoáng

Ngoài các nguyên tố hữu cơ C, H, O, N, trong tế bào VSV còn có các nguyên tố tro: P, S, K, Ca, Mg, Fe, Na, Mn và các nguyên tố vi lượng B, Mo, Zn, Cu, Br...

Lượng nguyên tố tro, nhất là nguyên tố vi lượng nói chung đều ít nhưng vô cùng quan trọng.

Thành phần các chất này cũng thay đổi tùy theo đặc tính sinh lý của từng loài VSV. Ví dụ: vi khuẩn lưu huỳnh nhiều S, vi khuẩn sắt nhiều Fe, vi khuẩn ở biển nhiều Na và Cl.

4.2. DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT

4.2.1. Nhu cầu dinh dưỡng

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, VSV đòi hỏi có nhiều thức ăn với tỷ lệ tương đối cao so với trọng lượng của cơ thể. Người chỉ cần một lượng thức ăn bằng 1% trọng lượng cơ thể, còn vi sinh vật cần một lượng bằng trọng lượng cơ thể nó, VSV sinh trưởng

và phát triển rất nhanh, chúng cần những thức ăn để tạo ra năng lượng và những thức ăn để tổng hợp các thành phần tế bào. Những thức ăn này bao gồm các nitơ hóa hợp (amino acid hoặc muối amonia), carbon hóa hợp thường là các ose nước và các muối khoáng ở dạng ion như PO_4H^- , Cl^- , SO_4^{2-} , K^+ , Ca^{2+} , Na^+ và một số ion kim loại hiếm ở nồng độ rất thấp (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+}).

Rất nhiều VSV phân lập trong tự nhiên có thể tổng hợp được mọi enzyme từ một hợp chất carbon độc nhất để hình thành những chất chuyển hóa cần thiết tham gia trong quá trình chuyển hóa.

4.2.2. Chất dinh dưỡng và môi trường nuôi cấy vi sinh vật

4.2.2.1. Chất dinh dưỡng

Các chất dinh dưỡng đối với VSV là những chất được VSV hấp thụ từ môi trường xung quanh và được chúng sử dụng làm nguyên liệu để cung cấp cho các quá trình tổng hợp tạo ra các thành phần của tế bào hoặc để cung cấp cho các quá trình trao đổi năng lượng.

Không phải mọi thành phần của MT nuôi cấy VSV đều được coi là chất dinh dưỡng. Chất dinh dưỡng thường là những chất có tham gia vào trao đổi chất nội bào gồm các hợp chất được dùng làm nguyên liệu để tổng hợp những vật liệu mới của tế bào: hợp chất chứa nitơ để tạo nên nhóm amine và imine ($-\text{NH}_2$, $=\text{NH}$).

Các hợp chất cung cấp năng lượng chủ yếu là các chất carbon, đường glucose...

Muối khoáng: đó là những nguyên tố như Ca, P, Mg, Fe, S... Hàm lượng chất khoáng thay đổi tùy theo từng loại VSV.

Nhờ sự hấp thu và đào thải các chất qua màng. Vi sinh vật có một số enzyme ngoại bào như enzyme amylase, protease, cellulase, pectinase..., chúng có tác dụng phân cắt các đại phân tử hữu cơ thành các phân tử nhỏ để dễ dàng vận chuyển qua màng.

4.2.2.2. Các loại môi trường nuôi cấy vi sinh vật

a) Phân loại môi trường dựa vào thành phần chất dinh dưỡng

– *Môi trường tự nhiên*: gồm các hợp chất tự nhiên, chưa xác định rõ thành phần, ví dụ môi trường sữa, nước chiết thịt bò, nước chiết các loại rau, quả... Để nuôi cấy vi khuẩn, người ta sử dụng môi trường canh thịt có thành phần như sau: thịt bò – 500 g; Peptone trypsine – 10 g; NaCl – 5 g; nước cất 1000 ml.

– *Môi trường tổng hợp* hay là môi trường đã biết thành phần hóa học. Ví dụ môi trường dưới đây dùng để nuôi cấy *Diplococcus desulfuricans* có thành phần như sau: Glucose – 50 g; K_2HPO_4 – 1 g; NH_4Cl – 1 g; CaSO_4 – 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2 g và nước cất 1000 ml.

– *Môi trường bán tổng hợp*: trong môi trường này có chứa một số hợp chất từ nguồn gốc tự nhiên, và một số chất hóa học đã biết rõ thành phần hóa học, đây là loại môi trường hay sử dụng, ví dụ môi trường EMB: Peptone trypsine – 10 g; K_2HPO_4 – 2 g; Eosin – 0,4 g; xanh methylene – 0,065 g; thạch – 15 g; nước cất 1000 ml.

– *Môi trường đặc biệt*: Dùng để nuôi cây một số VSV đặc biệt có tính ký sinh bắt buộc. Ví dụ: đối với virus gây bệnh đậu mùa, người ta nuôi cây chúng trên con bò còn sống và sau đó thu thập virus trên con bò ấy để làm thuốc chủng bệnh đậu mùa. Phần lớn các virus ký sinh trên động vật ta phải nuôi cây trong phôi của trứng gà lộn hoặc trên chuột, thỏ...

b) *Phân loại dựa vào trạng thái vật lý của môi trường*

+ *Môi trường lỏng* (hay dịch thể): thành phần chỉ có các chất dinh dưỡng và nước.

+ *Môi trường đặc* (hay cứng): là môi trường dịch thể có bổ sung 1,5 – 2% thạch (agar).

+ *Môi trường bán lỏng*: là môi trường dịch thể chứa 0,35 – 0,75% thạch.

+ *Môi trường xốp*: là môi trường có các nguyên liệu để làm xốp (cám, trấu, cơm, bánh mỳ...) thấm dung dịch chất dinh dưỡng.

4.2.3. Các kiểu dinh dưỡng ở vi sinh vật

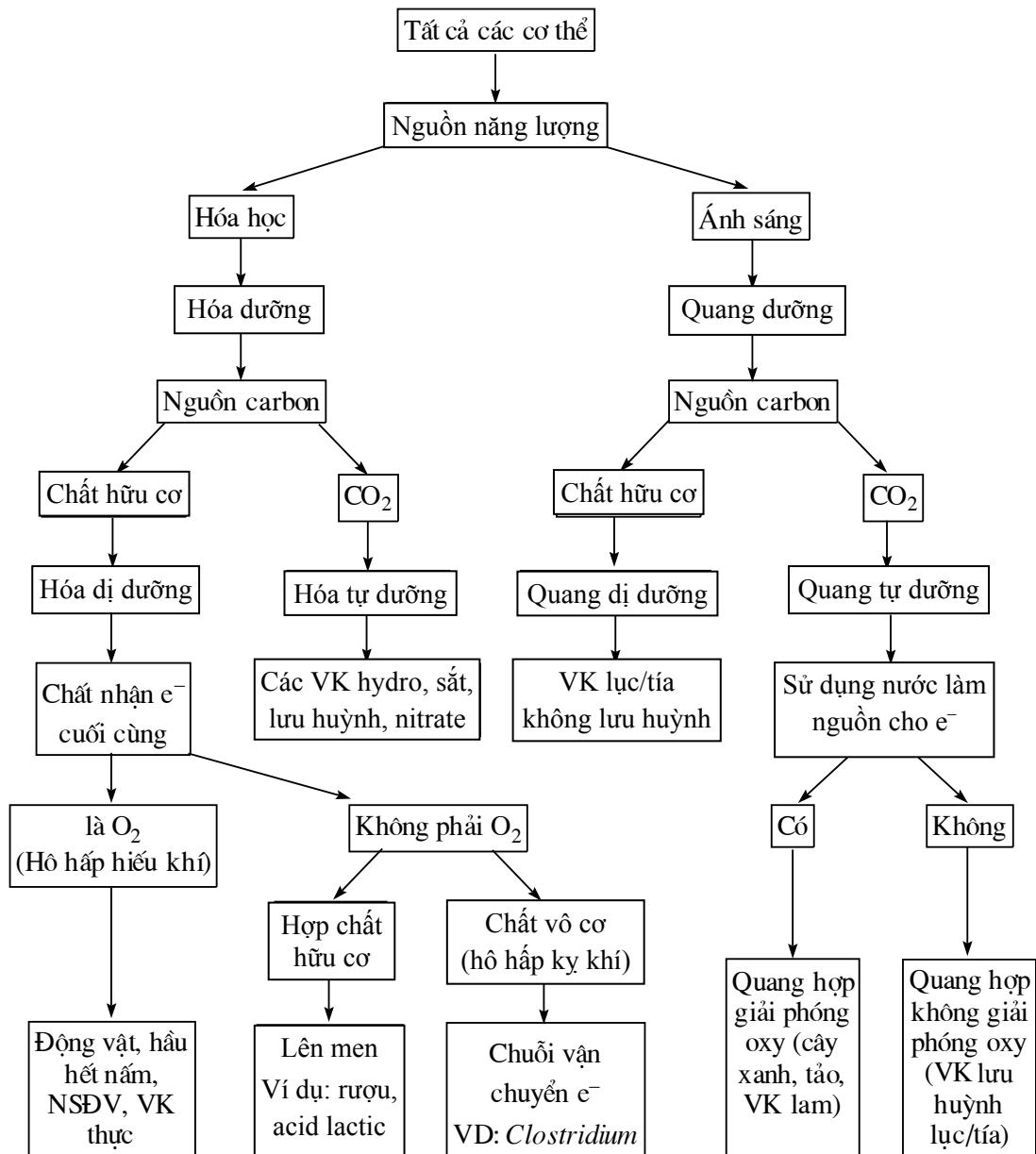
Căn cứ vào dạng năng lượng sử dụng, người ta có thể phân chia các kiểu dinh dưỡng ở vi sinh vật: xem hình 4.1.

Các cơ thể quang tự dưỡng (*Photoautotrophic*) hay quang dưỡng vô cơ (*photolithotrophic*) có thể chuyển năng lượng ánh sáng thành năng lượng trao đổi chất (ATP) và chất có tính khử (NADPH). CO₂ là nguồn carbon chủ yếu, H₂O hay H₂S là chất cho điện tử.

Có thể gặp những vi khuẩn quang hợp thải oxy giống như cây xanh, đại diện là các loài vi khuẩn lam (*Spirulina*, *Anabaena*, *Nostoc*...). Các tảo đơn bào quang hợp không thải oxy như các vi khuẩn lục thuộc họ *Chlorobacteriaceae* (*Chlorobium*, *Thiosulfatophilum*...), đây là những vi khuẩn quang dưỡng vô cơ ky khí với H₂S hoặc S₂O₃²⁻ làm chất cho điện tử. Các vi khuẩn lưu huỳnh màu tía thuộc bộ *Thiorhodobacteriales* như *Chromatium*, những vi khuẩn này có khả năng phát triển trên môi trường muối vô cơ như nhiều loại cây xanh, đây là những vi khuẩn ky khí quang dưỡng vô cơ khi có mặt trong môi trường S hoặc H₂S.

Các vi khuẩn quang dị dưỡng (*Photoheterotrophic*) hay quang dưỡng hữu cơ (*photoorganotrophic*), sử dụng ánh sáng làm nguồn năng lượng và hợp chất hữu cơ làm nguồn carbon, như các vi khuẩn màu tía không lưu huỳnh thuộc bộ *Athiorhodobacteriales*, họ *Athiorhodaceae*, các loài thuộc giống *Rhodospirillum*. Những vi khuẩn này thiêu về vi hiếu khí, là những vi khuẩn quang dưỡng hữu cơ, không có khả năng phát triển với H₂S là chất cho điện tử độc nhất, chất cho điện tử của chúng là acetate, succinate hay hydro.

Các vi khuẩn hóa dưỡng vô cơ (*Chemolithotrophic*) hay hóa tự dưỡng (*Chemoautotrophic*) sử dụng năng lượng được tạo thành từ các phản ứng hóa học và CO₂ làm nguồn carbon.



Hình 4.1. Sơ đồ tóm tắt các kiểu dinh dưỡng ở vi sinh.

Năng lượng có được là nhờ oxy hóa các hợp chất vô cơ như NH₄⁺, NO₂⁻, H₂, H₂S, S, S₂O₃²⁻, Fe²⁺... Chúng hình thành một nhóm VSV rất hạn chế tham gia vào các chu trình vật chất sống ở trong đất và nước như *Hydrogenomeonas* oxy hóa hydro, *Nitrosomonas* oxy hóa NH₃, *Nitrobacter* oxy hóa nitrite, *Thiobacillus* oxy hóa các hợp chất khử của lưu huỳnh...

Các cơ thể hóa dị dưỡng (*Chemoheterotrophic*) hay hóa dưỡng hữu cơ (*Chemoorganotrophic*) bao gồm các vi khuẩn, vi nấm, động vật nguyên sinh, động vật, chúng sử dụng năng lượng hóa học và cơ chất hữu cơ làm nguồn carbon chủ yếu. Một nhóm lớn các vi khuẩn hóa dưỡng hữu cơ là những vi sinh vật gây bệnh rất được chú ý

trong y học, các vi khuẩn tập nhiễm vào thức ăn, các vi khuẩn được sử dụng trong công nghiệp để tổng hợp các chất kháng sinh, các loại vitamin, các amino acid...

4.2.4. Vi sinh vật nguyên dưỡng và khuyết dưỡng

Tùy thuộc vào nhu cầu của các chất này mà người ta thường chia VSV thành hai nhóm:

- Nguyên dưỡng (prototrophes) là những vi sinh vật không nhất thiết cần các nhân tố sinh trưởng, những yếu tố của môi trường nuôi cây thường là đầy đủ đối với chúng.
- Khuyết dưỡng (auxotrophes) là những VSV đòi hỏi các chất hữu cơ nhất định cần cho sự sinh trưởng của chúng.

4.3. SINH TRƯỞNG VÀ SINH SẢN CỦA VI SINH VẬT

4.3.1. Các nhân tố sinh trưởng

Một số VSV mất khả năng tổng hợp một vài hợp chất và đòi hỏi được cung cấp ở trong môi trường nuôi cây. Đó là những nhân tố sinh trưởng, chúng được chia làm hai loại:

- + Một loại cần được cung cấp từng lượng nhỏ và đảm nhận nhiệm vụ xúc tác như một thành phần của enzyme, ví dụ vitamin nhóm B.
- + Một loại cần được cung cấp với lượng lớn hơn và được dùng làm nguyên liệu cấu tạo tế bào như amino acid, purine, pyrimidine.

Mỗi loại VSV cần những nhân tố sinh trưởng khác nhau. Hầu như không có chất nào là chất sinh trưởng chung đối với các loại VSV. Ví dụ liên cầu khuẩn (*Streptococcus*) dung huyết nếu thiếu vitamin B₁ sẽ không nhân lên được, nấm men và vi khuẩn lactic cần biotin.

4.3.2. Điều kiện sinh trưởng

Sinh trưởng và trao đổi chất của vi sinh vật liên quan chặt chẽ với các điều kiện của môi trường bên ngoài. Các điều kiện này bao gồm hàng loạt các yếu tố khác nhau, tác động qua lại với nhau. Đa số các yếu tố đó đều có một đặc tính tác dụng chung biểu hiện ở ba điểm hoạt động là tối thiểu, tối thích và cực đại.

4.3.2.1. Cơ chế tác dụng của các yếu tố bên ngoài lên vi sinh vật

Các yếu tố của môi trường bên ngoài tác dụng lên tế bào thuộc ba loại là yếu tố vật lý (độ ẩm, nhiệt độ, áp lực, tia bức xạ...), yếu tố hóa học (pH môi trường, thể nồng oxy hóa khử, các chất diệt khuẩn...) và yếu tố sinh học (chất kháng sinh, kháng thể...). Tác dụng có hại của các yếu tố bên ngoài tế bào thể hiện chủ yếu ở những biến đổi sau đây:

- Phá hủy thành tế bào: một số chất như enzyme lysozyme (chứa trong lá lách, bạch cầu, lòng trắng trứng, đuôi thực khuẩn thể...) có khả năng phân hủy thành tế bào vi khuẩn.
- Biến đổi tính thẩm của màng tế bào.

– Thay đổi đặc tính keo của nguyên sinh chất: chẳng hạn nhiệt độ cao làm biến tính protein và làm chúng đông tụ do khả năng khử nước.

– Kìm hãm hoạt tính: một số chất tác động vào các hệ thống sinh năng lượng của tế bào, cyanide kìm hãm cytochrome oxydase, fluoride ngăn cản quá trình đường phân, các hợp chất hóa trị ba của arsenic bao vây chu trình Krebs, dinitrophenol kìm hãm quá trình phosphoryl hóa oxy hóa. Các chất oxy hóa mạnh (H_2O_2 , halogen) phá hủy các hệ thống tế bào làm tổn hại đến chức phận trao đổi chất. Các enzyme khác có thể bị bất hoạt khi liên kết với các yếu tố kim loại như thủy ngân.

– Hủy hoại các quá trình tổng hợp.

4.3.2.2. Các nhân tố ảnh hưởng

a) Các yếu tố vật lý

– Độ ẩm: Nước cần thiết cho hoạt động sống của VSV. Làm mất nước VSV sẽ chết. Tốc độ chết phụ thuộc vào môi trường của VSV. Trong hỗn dịch nước thường khi làm mất nước VSV chết nhanh hơn là trong hỗn dịch keo. Nếu đem môi trường làm đóng băng trước rồi mới làm mất nước thì tỷ lệ chết của VSV rất thấp. Phương pháp này được áp dụng để làm đông khô.

Do VSV cần độ ẩm nhất định để sinh trưởng nên bằng cách phơi khô hoặc sấy khô ta có thể bảo quản được lâu dài nhiều loại sản phẩm (hoa quả khô, cá, thịt khô...).

– Nhiệt độ: Hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật có thể coi là kết quả của các phản ứng hóa học. Vì các phản ứng này phụ thuộc chặt chẽ vào nhiệt độ nên yếu tố nhiệt rõ ràng ảnh hưởng sâu sắc đến các quá trình sống của tế bào.

Nhiệt độ thấp (dưới vùng sinh động học) có thể làm bất hoạt quá trình vận chuyển các chất hòa tan qua màng tế bào do thay đổi cấu hình không gian của một số permease chứa trong màng hoặc ảnh hưởng đến việc hình thành và tiêu thụ ATP cần cho quá trình vận chuyển chủ động các chất dinh dưỡng.

– Áp lực: Áp suất thẩm thấu và áp suất thủy tĩnh có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của tế bào vi khuẩn. Đa số vi khuẩn sinh trưởng tốt trong môi trường chứa ít hơn 2% muối, nồng độ muối cao hơn có hại cho tế bào. Nhưng cũng có một số vi khuẩn lại sinh trưởng tốt nhất trong môi trường chứa tới 30% muối, ta gọi là các vi khuẩn ura muối (halophilic). Nhiều vi khuẩn ở biển thuộc nhóm này, chúng không có khả năng phát triển ở những nồng độ đường cao.

– Các tia bức xạ: Các tia có thể gây những biến đổi hóa học là ánh sáng mặt trời, tia tử ngoại, tia X, tia gamma và tia vũ trụ. Ánh sáng mặt trời có thể gián tiếp tác động lên tế bào do làm biến đổi môi trường. Tia tử ngoại có tác dụng mạnh nhất ở bước sóng 260 nm, đây là vùng hấp thụ cực đại của acid nucleic và nucleoprotein gây dimer hóa thymine, dẫn đến ức chế sự nhân đôi của DNA. Nhưng sau khi chiếu tia tử ngoại, nếu đưa vi khuẩn ra ánh sáng ban ngày thì vi khuẩn có thể phục hồi khả năng sinh trưởng và phân chia. Hiện tượng này gọi là quang tái hoạt (photoreactivation).

– Âm thanh: Sóng âm thanh, đặc biệt trong vùng siêu âm (trên 20 kHz) có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng của vi khuẩn, các tế bào sinh dưỡng bị chết nhanh chóng.

b) Các yếu tố hóa học

– Ảnh hưởng của pH môi trường: pH của môi trường có ý nghĩa quyết định đối với sinh trưởng của nhiều vi sinh vật. Đa số vi khuẩn sinh trưởng tốt nhất ở pH trung tính (7,0) như nhiều vi khuẩn gây bệnh (môi trường tự nhiên là máu và bạch huyết của cơ thể động vật có pH khoảng 7,4). Các vi khuẩn nitrate hóa, vi khuẩn nốt sần, xạ khuẩn, vi khuẩn phân giải urea lại ưa môi trường hơi kiềm. Một số vi khuẩn chịu acid (vi khuẩn lactic, *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi*), một số khác ưa acid như *Acetobacter acidophilus*, *Thiobacillus thiooxydans* (oxy hóa lưu huỳnh thành H_2SO_4) có thể sinh trưởng ở pH < 1.

Nấm mốc và nấm men ưa pH acid (pH 4 – 6). pH môi trường không những ảnh hưởng mạnh mẽ đến sinh trưởng mà còn tác động sâu sắc đến các quá trình trao đổi chất.

– Ảnh hưởng của oxy: Tùy thuộc vào nhu cầu đối với oxy mà người ta chia vi sinh vật thành các nhóm sau:

+ *Hiếu khí bắt buộc*: thuộc nhóm này là các vi sinh vật chỉ có thể sinh trưởng được khi có mặt oxy phân tử (O_2), chúng có chuỗi hô hấp hoàn chỉnh, dùng O_2 làm chất nhận hydro cuối cùng. Trong các tế bào có chứa enzyme SOD (superoxide dismutase), catalase và peroxidase có tác dụng chuyển hóa các gốc O_2^{2-} và O_2^- để giải độc cho tế bào. Tuyệt đại đa số vi nấm và số đông vi khuẩn thuộc nhóm này.

+ *Hiếu khí không bắt buộc*: thuộc nhóm này là các vi sinh vật có thể sinh trưởng được cả trong điều kiện có oxy lẫn không có oxy. Khi có oxy chúng tiến hành hô hấp tế bào. Khi không có oxy chúng tiến hành lên men, ví dụ nấm men rượu, vi khuẩn lactic. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra trong tế bào có chứa enzyme SOD (superoxid dismutase) và peroxidase, khi có oxy chúng sinh trưởng tốt hơn. Phần lớn nấm men và nhiều vi khuẩn thuộc nhóm này. Có thể kể đến các loài như *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*.

+ *Vi hiếu khí*: thuộc nhóm này là các vi sinh vật chỉ có thể sinh trưởng được ở điều kiện áp lực oxy rất thấp. Chúng cũng thông qua chuỗi hô hấp và dùng oxy làm chất nhận hydro cuối cùng. Có thể kể đến các loài như *Vibrio cholerae*, *Hydrogenomeonas spp*, *Zymomonas spp*, *Bacteroides spp*...

+ *Kỵ khí*: với các vi sinh vật thuộc nhóm này sự có mặt của oxy phân tử là có hại. Chúng không sinh trưởng được trên môi trường đặc hoặc bán đặc khi để trong không khí hay trong không khí có chứa khoảng 10% CO_2 . Chúng chỉ sinh trưởng được ở lớp thể dịch sâu, nơi không có oxy, có các quá trình lên men, quá trình phosphoryl hóa quang hợp, quá trình methane hóa... Trong tế bào của các vi sinh vật này không có enzyme SOD, cytochrome oxidase, phần lớn không có hydrogenperoxidase. Có thể kể đến rất nhiều loài trong các chi *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Butyrivibrio*, *Desulfovibrio*, *Veillonella*...

– Các chất diệt khuẩn (sát trùng): thường sử dụng là phenol và các dẫn xuất của phenol, alcohol, halogen, kim loại nặng, H₂O₂, xà phòng, thuốc nhuộm và các chất tẩy rửa tổng hợp của các muối ammonium.

c) *Các yếu tố sinh học*

Trong các yếu tố sinh học ảnh hưởng có hại lên các quá trình sống của vi sinh vật cần kể đến kháng thể và kháng sinh. Chất kháng sinh có thể có từ nhiều nguồn gốc khác nhau như tổng hợp hóa học, chiết xuất từ thực vật, động vật nhưng chủ yếu là được tổng hợp từ vi sinh vật. Đây là các chất đặc hiệu mà ở nồng độ thấp cũng có khả năng ức chế hoặc tiêu diệt vi sinh vật một cách chọn lọc.

Kháng thể là những chất có sẵn trong máu hoặc được xuất hiện khi có kháng nguyên xâm nhập vào cơ thể, có khả năng liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên để làm mất hoạt lực của kháng nguyên.

4.3.3. Sinh lý học sinh trưởng của vi sinh vật

4.3.3.1. Các phương pháp xác định số lượng và sinh khối vi khuẩn

a) *Xác định sinh khối vi khuẩn*

– Các phương pháp trực tiếp gồm có:

+ Xác định sinh khối tươi hoặc sinh khối khô bằng cách cân (phương pháp này kém chính xác).

+ Xác định hàm lượng nitơ tổng số (phương pháp Kjelhdal) hay hàm lượng carbon tổng số (theo Vslike – Folch), các phương pháp này cho độ chính xác cao.

– Các phương pháp gián tiếp để đo sinh khối vi khuẩn:

+ Đo độ đục của dịch treo tế bào, đây là phương pháp rất thuận lợi. Trong thực tế, ta thường đo mật độ quang học của dịch treo, trong một số trường hợp người ta cũng xác định sự khuếch tán ánh sáng.

+ Đo các chỉ số cường độ trao đổi chất như hấp thụ O₂, tạo thành CO₂ hay acid, vì các chỉ số này liên quan trực tiếp với sinh trưởng. Dĩ nhiên ta chỉ dùng các phương pháp này trong trường hợp không sử dụng được các phương pháp khác, ví dụ khi mật độ sinh khối rất nhỏ.

b) *Xác định số lượng tế bào*

Đếm số khuẩn lạc (CFU) tạo thành bởi các vi khuẩn sống trong điều kiện sinh trưởng thuận lợi. Số khuẩn lạc cũng rất phụ thuộc vào thành phần môi trường. Tế bào mọc thành khuẩn lạc trên môi trường này không nhất thiết cũng cho xuất hiện khuẩn lạc trên môi trường khác.

Với một số loại vi khuẩn khó phát triển trên môi trường thạch, người ta có thể kiểm tra số lượng bằng phương pháp pha loãng liên tiếp sau đó cấy từ mỗi độ pha loãng 1 ml vào từng ống đựng môi trường chỉ thị (nếu có một vi khuẩn đưa vào cũng đủ cho phản ứng dương tính sau khi nuôi cấy). Phương pháp này gọi là phương pháp kiểm tra số lượng VSV

bằng cách pha loãng tìm giới hạn phát triển (MPN = Most Probable Number). Có thể cấy vào 5 ống và lấy số liệu ở 3 độ pha loãng cuối (có phản ứng dương tính) rồi tra bảng để tìm ra số lượng gần đúng mật độ vi khuẩn.

Hoặc có thể lọc mẫu qua màng lọc vi khuẩn rồi đặt màng lọc lên đĩa môi trường thạch để kiểm tra số khuẩn lạc mọc và suy ra mật độ vi sinh vật trong mẫu.

Nếu kích thước của tế bào khá lớn có thể đếm trực tiếp trên phòng đếm (thường hay dùng các loại phòng đếm Thomas hay Goriaev).

4.3.3.2. Lý thuyết về sinh trưởng lũy thừa và thời gian thế hệ

Sinh trưởng và phát triển là thuộc tính cơ sở của vi sinh vật. Sinh trưởng là sự tăng kích thước và khối lượng tế bào, còn phát triển (sinh sản) là sự tăng số lượng tế bào. Giả sử trong một bình kín chứa một lượng lớn môi trường dinh dưỡng, ta cấy vào đó một tế bào vi khuẩn. Nếu thành phần môi trường hoàn toàn phù hợp với nhu cầu của tế bào, vi khuẩn sẽ sinh trưởng, tăng khối lượng và thể tích, tổng hợp các thành phần của tế bào (thành tế bào, màng tế bào chất, DNA, RNA, protein...) cho đến khi kích thước lớn gấp đôi và vi khuẩn sẽ phân chia cho 2 tế bào. Hai tế bào này lại tiếp tục sinh trưởng và phân chia để cho 4, 8, 16 tế bào...

a) Tính số lượng tế bào vi khuẩn sau số lần phân chia thế hệ n

Nếu số tế bào ban đầu không phải là 1 mà là N_0 thì sau n lần phân chia ta sẽ có số tế bào tổng cộng là N:

$$N = N_0 \cdot 2^n \quad (4.1)$$

Các giá trị N và N_0 có thể xác định nhờ phòng đếm hoặc tính số khuẩn lạc mọc trên môi trường đặc. Còn giá trị n (số thế hệ) có thể tính nhờ logarithm thập phân:

Logarithm cả hai vế ta có:

$$\lg N = \lg N_0 + n \lg 2$$

$$\text{Từ đó } \rightarrow n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2} \quad (4.2)$$

b) Tính thời gian thế hệ g

Số lần phân chia trong 1 giờ hay hằng số tốc độ phân chia là:

$$g = \frac{t_2 - t_1}{n} = \lg 2 \cdot \frac{t_2 - t_1}{\lg N - \lg N_0} \quad (4.3)$$

Ở đây $t_2 - t_1$ biểu thị sự sai khác giữa thời gian đầu (t_1) và thời gian cuối (t_2) tính bằng giờ, trong đó số tế bào được xác định.

c) Hằng số tốc độ phân chia (c)

Số lần phân chia trong một đơn vị thời gian (tức 1 giờ) gọi là hằng số tốc độ phân chia c.

$$c = \frac{t}{g} = \frac{n}{t} = \frac{1}{\lg 2} = \frac{\lg N - \lg N_0}{t_2 - t_1} \quad (4.4)$$

Thời gian thế hệ càng ngắn, vi khuẩn sinh trưởng và sinh sản càng nhanh

Vì $c = \frac{n}{t}$ nên $n = ct$

Thay giá trị n vào phương trình (4.1) ta có $N = N_0 \cdot 2^{ct}$.

Hàng số tốc độ phân chia (c) phụ thuộc vào một số điều kiện: loài vi khuẩn, nhiệt độ nuôi cây, môi trường nuôi cây.

4.3.3.3. Sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường nhân tạo

Vi khuẩn muốn sinh trưởng phát triển phải có môi trường và điều kiện thích hợp. Một tế bào vi khuẩn riêng rẽ thì rất nhỏ, nhưng vi khuẩn sinh trưởng và phát triển rất nhanh. Tính chất phát triển này cho phép ta nghiên cứu cả quần thể vi khuẩn chứ không phải từng vi khuẩn riêng lẻ.

a) *Dường cong sinh trưởng của vi khuẩn khi nuôi cây không liên tục trong môi trường lỏng*

Nuôi cây không liên tục là phương pháp nuôi cây mà trong suốt thời gian đó ta không thêm vào chất dinh dưỡng cũng không loại bỏ đi các sản phẩm cuối cùng của trao đổi chất (quần thể tế bào bị giới hạn trong một khoảng không gian nhất định). Sự sinh trưởng trong một “hệ thống đóng” hay “hệ kín” như vậy tuân theo những quy luật bắt buộc.

Đồ thị biểu diễn đường cong sinh trưởng của vi khuẩn khi nuôi cây không liên tục, sự phụ thuộc của nồng độ sinh khối theo thời gian (hình 4.2).

Trong điều kiện nhân tạo như nuôi cây vi khuẩn trên môi trường lỏng trong chai tam giác hay bình lén men theo mẻ, quá trình sinh trưởng diễn ra qua bốn pha:

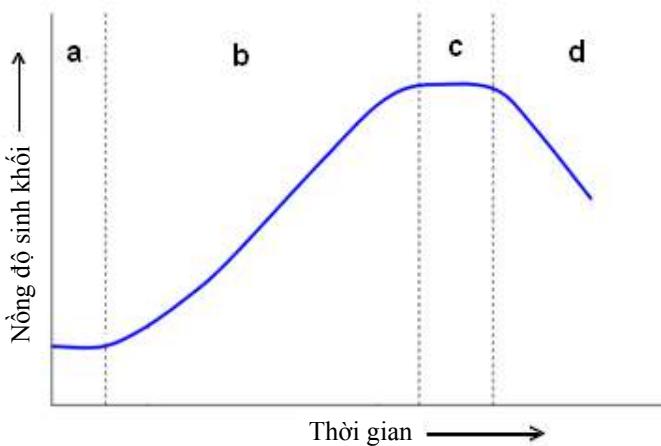
– *Pha tiềm phát (pha lag)*

Vi khuẩn thích nghi với môi trường, số lượng tế bào trong quần thể chưa tăng. Enzyme cảm ứng được hình thành để phân hủy cơ chất.

– *Pha lũy thừa (log)*

Vi khuẩn sinh trưởng với tốc độ lớn nhất và không đổi, số lượng tế bào trong quần thể tăng lên rất nhanh. Thông thường pha này gồm hai giai đoạn (giai đoạn tăng tốc và giai đoạn lũy thừa).

Nếu số tế bào ban đầu là N_0 thì sau n lần phân chia sẽ có số tế bào tổng cộng là hay $N = N_0 \cdot 2^{ct}$.



Hình 4.2. Đồ thị sinh trưởng của vi khuẩn trong nuôi cấy không liên tục

- a. Pha tiềm phát (lag phase); b. Pha lũy thừa – pha log (exponential phase);
- c. Pha cân bằng (stationary phase); d. Pha suy vong (death phase).

– Pha cân bằng động

Số lượng vi khuẩn trong quần thể đạt đến cực đại và không đổi theo thời gian, số lượng tế bào sinh ra tương đương số lượng tế bào chết đi. Thông thường pha này gồm hai giai đoạn (giai đoạn tăng chậm và giai đoạn cân bằng động).

– Pha suy vong

Số tế bào sống trong quần thể giảm dần do tế bào trong quần thể bị phân hủy ngày càng nhiều, chất dinh dưỡng cạn kiệt, chất độc hại tích lũy quá nhiều.

Toàn bộ quá trình nuôi gắn liền với sự thay đổi kéo dài của các điều kiện nuôi. Chất dinh dưỡng giảm đi, số lượng tế bào tăng lên rồi giảm dần, đồng thời hoạt tính trao đổi chất cũng thay đổi.

Trong lên men, các pha log và ổn định có vai trò quyết định để tạo sản phẩm. Sẽ có lợi hơn khi giảm thiểu pha lag, bằng bổ sung giống mạnh hay tăng lượng giống, để tăng năng suất. Thường tốc độ chết của tế bào có ý nghĩa trong công nghiệp thực phẩm và xử lý nước thải.

b) Sự phát triển của vi khuẩn trên môi trường đặc

Thành phần hóa học của môi trường đặc giống như môi trường lỏng, chỉ khác là có thêm chất để cho rắn lại (thường dùng là thạch – agar). Nếu cây vi khuẩn trên môi trường đặc để vi khuẩn nở đủ cách xa vi khuẩn kia thì mỗi vi khuẩn sẽ hình thành một khuẩn lạc riêng rẽ, mỗi khuẩn lạc là 1 CFU thuần khiết, gồm những tế bào từ một tế bào mẹ sinh ra.

Các loại vi khuẩn khác nhau thì có khuẩn lạc khác nhau về hình dạng, kích thước, độ đục, màu sắc... Có ba dạng khuẩn lạc chính:

- Dạng S (Smooth – nhẵn nhụi): Khuẩn lạc xám nhạt hoặc trong, bờ đều, mặt lồi và bóng.

– Dạng R (rough – xù xì): Khuẩn lạc thường dẹt, bờ đều hoặc nhăn nheo, mặt xù xì, khô (dễ tách thành mảng hay cả khói).

– Dạng M (mucoid – nhầy nhót): Khuẩn lạc đục, lồi ít hơn khuẩn lạc S, quánh hoặc dính.

4.3.3.4. Sinh trưởng thêm và sinh trưởng kép

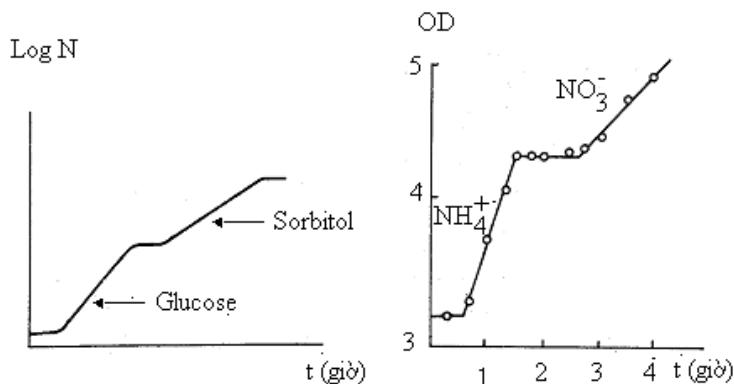
a) Sinh trưởng thêm

Trong pha suy vong, các vi khuẩn không phân chia và rất nhiều vi khuẩn chết hoặc tự thủy phân bởi chính các enzyme do chúng giải phóng ra. Tuy nhiên, có một số nhỏ vi khuẩn sống sót, có thể thoát chết và lại có thêm vài lần nhân lên nữa, hiện tượng này gọi là sinh trưởng thêm.

Nếu trong môi trường có hỗn hợp gồm hai hay nhiều hợp chất carbon, nitơ, lúc đầu vi khuẩn tổng hợp enzyme phân giải hợp chất dễ đồng hóa, sau đó khi chất này đã cạn; vi khuẩn lại được chất tiếp theo cảm ứng để tổng hợp loại enzyme phân giải hợp chất tiếp theo.

b) Sinh trưởng kép

Đặc trưng của hiện tượng sinh trưởng kép là đường cong sinh trưởng gồm hai pha lag và hai pha log. Sau khi kết thúc pha log thứ nhất, tế bào lại mở đầu pha lag thứ hai và tiếp tục pha log thứ hai (hình 4.3).



Hình 4.3. Đường cong sinh trưởng kép của *E. coli* trong môi trường hỗn hợp glucose-sorbitol (trái); *Aerobacter aerogenes* trong môi trường hỗn hợp muối ammonium và nitrate (phải).

Hiện tượng sinh trưởng kép thường gặp khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường chứa nguồn carbon gồm một hỗn hợp của hai hay nhiều chất hữu cơ khác nhau. Khi sinh trưởng tế bào sẽ đồng hóa trước tiên nguồn carbon nào mà chúng “ưa thích” nhất. Đồng thời cơ chất thứ nhất này đã kìm hãm các enzyme cần cho việc đồng hóa cơ chất thứ hai. Chỉ sau khi nguồn carbon thứ nhất đã cạn thì nguồn carbon thứ hai mới có thể cảm ứng tổng hợp nên các enzyme cần trong việc chuyển hóa nó.

Hiện tượng sinh trưởng kép không chỉ hạn chế ở các nguồn carbon và năng lượng mà còn thấy ở các nguồn nitơ và phosphor. Chẳng hạn *Aerobacter aerogenes* có thể sử dụng nguồn nitơ là amino acid, muối ammonium và nitrate. Nếu khi cấy chuyển vi khuẩn từ môi

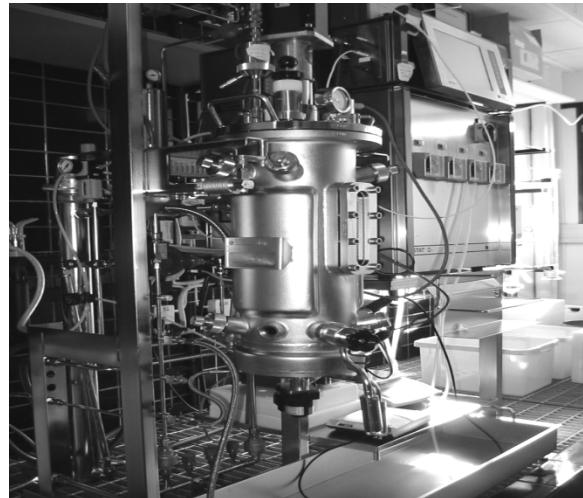
trường nước thịt sang môi trường chứa muối ammonium hoặc nitrate thì pha lag sẽ biến hiện. Nếu từ môi trường nước thịt sang môi trường chứa hỗn hợp cả hai loại muối sẽ thấy có hiện tượng sinh trưởng kép. Các ion NH_4^+ được đồng hóa trước đồng thời kiềm chế việc tổng hợp cảm ứng enzymenitrate reductase. Chỉ sau khi hết muối ammonium trong môi trường thì muối nitrate mới được sử dụng.

Sinh trưởng kép là hiện tượng phổ biến, có thể giải thích bằng cơ chế kiềm chế nói chung và đặc biệt bằng hiệu ứng glucose.

Trong nuôi cây không liên tục, không có sự bổ sung chất dinh dưỡng mới, cũng không rút bỏ các chất thải và sinh khối của tế bào dư thừa. Do đó pha log thường chỉ kéo dài qua vài thế hệ. Vì vậy, để thu được sinh khối hoặc sản phẩm của VSV trong công nghệ, người ta sử dụng phương pháp nuôi liên tục.

4.3.3.5. Sinh trưởng trong nuôi cây liên tục

Nuôi cây liên tục các điều kiện môi trường duy trì ổn định nhờ việc bổ sung thường xuyên chất dinh dưỡng và loại bỏ không ngừng các chất thải. Trong một hệ thống mở như vậy, quần thể VSV có thể sinh trưởng ở pha log trong một thời gian dài, mật độ VSV tương đối ổn định. Yếu tố thời gian ở đây trong phạm vi nhất định bị loại trừ. Tế bào được cung cấp những điều kiện môi trường không đổi nhờ việc điều chỉnh tự động (hình 4.4). Nuôi liên tục được sử dụng để sản xuất sinh khối VSV, các enzyme, vitamin...



Hình 4.4. Nuôi cây liên tục trong bioreactor.

Thông thường sản phẩm của VSV chia thành hai loại. Sản phẩm bậc I (sản phẩm sơ cấp) và sản phẩm bậc II (thứ cấp). Sản phẩm bậc I được tạo thành ở pha log, ví dụ enzyme, amino acid, vitamin... Sản phẩm bậc hai được tạo thành ở pha cân bằng, ví dụ chất kháng sinh, độc tố nấm...

4.3.4. Sinh trưởng trong môi trường tự nhiên

Sergei Winogradsky (1856 – 1953) là cha đẻ của vi sinh vật đất, đã đưa ra hệ thống phân loại sinh thái bản địa với hai dạng chính. Dạng thứ nhất, các vi sinh vật chuyển hóa vật chất rất chậm trong đất, sử dụng các chất dinh dưỡng giải phóng từ các nguồn hữu cơ làm cơ chất. Dạng thứ hai, các vi sinh vật ở trạng thái ngủ khi cơ chất cần thiết nghèo nàn và sinh trưởng rất nhanh khi các chất dinh dưỡng được bổ sung. Bổ sung hai dạng trên là các VSV nhập cư, chỉ tồn tại trong thời gian ngắn.

Ngày nay, thuật ngữ vi sinh vật đất được chia thành vi sinh vật khuyết dưỡng (oligotroph) thích môi trường có hàm lượng cơ chất thấp và vi sinh vật ura dưỡng (copiotroph) yêu cầu môi trường có hàm lượng cơ chất cao. Vi sinh vật khuyết dưỡng có các pha sinh trưởng không giống như các pha sinh trưởng của vi khuẩn được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm và nuôi cây liên tục. Các vi sinh vật này chuyển hóa vật chất rất chậm nên thời gian mỗi thế hệ dài. Chúng sử dụng năng lượng từ quá trình trao đổi chất để duy trì hoạt động tế bào. Trái với vi sinh vật khuyết dưỡng, sinh vật ura dưỡng có quá trình trao đổi chất xảy ra rất nhanh nên pha log xảy ra với khoảng thời gian ngắn sau đó chuyển qua trạng thái ngủ với khoảng thời gian rất dài trong môi trường. Các vi khuẩn thường thay đổi linh hoạt giữa trạng thái sinh trưởng và không sinh trưởng tùy thuộc vào dưỡng chất trong môi trường. Tế bào ở trạng thái ngủ thường tròn và có kích thước nhỏ ($0,3 \mu\text{m}$) so với tế bào sinh trưởng ($1 - 2 \mu\text{m}$). Các pha sinh trưởng của vi sinh vật trong đất gồm có:

a) *Pha tiềm phát (pha lag)*

Pha tiềm phát ở trong môi trường tự nhiên thường kéo dài hơn trong môi trường nuôi cấy.

Trong nhiều trường hợp, pha tiềm phát kéo dài do số lượng tế bào của quần thể ban đầu có thể thực hiện quá trình trao đổi chất ít. Những chất hữu cơ gây ô nhiễm cho con người thường là nguồn cơ chất cho vi sinh vật phát triển bằng cách tiết các enzyme để phân hủy các chất ô nhiễm. Trong môi trường nuôi cấy, chuyển tiếp giữa pha tiềm phát và pha lũy thừa được định nghĩa bằng số lượng tế bào tăng gấp đôi so với số lượng gốc đem nuôi cấy. Tuy nhiên, trong tự nhiên việc xác định chính xác tế bào rất khó, vì chỉ một số lượng nhỏ VSV trong quần xã có thể sử dụng các chất dinh dưỡng bổ sung hay các nguồn chất gây ô nhiễm. Hơn nữa, quần thể có khả năng trao đổi cơ chất có thể ở trạng thái ngủ đông hoặc đòi hỏi thời gian để thích ứng hoạt động trao đổi chất. Thời gian sinh trưởng mỗi thế hệ cũng dài hơn nhiều so với trong môi trường nuôi cấy. Điều này tùy thuộc vào hạn chế nguồn dinh dưỡng hiện hữu và các điều kiện môi trường như nhiệt độ và độ ẩm không thích ứng với mỗi loại vi sinh vật.

Cách giải thích khác cho quá trình kéo dài pha tiềm phát là do quần xã vi sinh vật trong môi trường thường sử dụng nguồn carbon đặc thù nhưng không có trong quần xã đó. Để tồn tại thì yêu cầu phải có đột biến hoặc quá trình chuyển gene có khả năng phân hủy các hợp chất tương ứng để các vi sinh vật trong quần xã chuyển hóa. Ví dụ, chuyển plasmid pJIP4 mang gene mã hóa enzyme phân hủy thuốc diệt cỏ 2,4-D từ *Ralstonia eutrophus* JMP134 được đưa vào đất cho các vi sinh vật bản địa *Pseudomonas glathei* và *Burkholderia caryophylli*. Plasmid được chuyển vào vi sinh vật bản địa giúp phân hủy nhanh và hoàn toàn thuốc diệt cỏ 2,4D.

b) *Pha lũy thừa (pha log)*

Trong tự nhiên, quãng thời gian của pha log sinh trưởng xảy ra rất nhanh sau khi bổ sung cơ chất. Các cơ chất dinh dưỡng có thể là các phần còn lại sau khi thu hoạch, rơm rạ, phần rễ cây hay các chất ô nhiễm được thải ra môi trường. Sau khi bổ sung, các vi sinh vật

sản sinh enzyme được hoạt hóa từ trạng thái ngủ để chuyển hóa các nguồn dinh dưỡng. Sau khi hoạt hóa, vi sinh vật chuyển qua pha log cho đến khi cơ chất được sử dụng hoặc đến khi xuất hiện một số yếu tố giảm cơ chất. Vi sinh vật ở trong tự nhiên xen kẽ giữa pha log và pha cân bằng.

Trong môi trường tự nhiên, nồng độ các chất dinh dưỡng, nhiệt độ và độ ẩm thường không lý tưởng như môi trường nuôi cây trong điều kiện phòng thí nghiệm nên tốc độ sinh trưởng thường thấp hơn môi trường nuôi cây.

c) *Pha cân bằng*

Ở môi trường nuôi cây pha cân bằng biểu thị số lượng tế bào sinh trưởng bằng số lượng tế bào chết. Trong môi trường tự nhiên, pha cân bằng xảy ra rất ngắn giống như pha log. Các tế bào sinh trưởng để sử dụng nhanh các chất dinh dưỡng được bổ sung.

d) *Pha suy vong*

Pha suy vong trong môi trường được xác định bằng cách đếm số lượng tế bào có thể nuôi cây được. Cả tế bào sống và chết đều trở thành con mồi cho động vật nguyên sinh. Phage có thể xâm nhiễm và làm tan một phần lớn vi khuẩn trong quần xã. Các tế bào chết trở thành nguồn cung cấp cơ chất carbon và nitơ cho các vi sinh vật trong không gian sống.

4.3.5. Sinh sản ở vi sinh vật

4.3.5.1. Sinh sản ở vi khuẩn (*Bacteria*) và vi khuẩn cổ (*Archaea*)

a) *Sinh sản phân đôi*: Vi khuẩn và vi khuẩn cổ sinh sản bằng cách chia đôi từ một tế bào mẹ tách thành hai tế bào con. Sự phân chia bắt đầu từ NST của vi khuẩn, sau đó màng sinh chất và thành (vách) tiến sâu vào, phân chia tế bào thành hai phần, hình thành hai tế bào con. Thời gian phân chia của các vi khuẩn thường là 20 phút đến 30 phút, riêng vi khuẩn lao là 30 giờ một thế hệ.

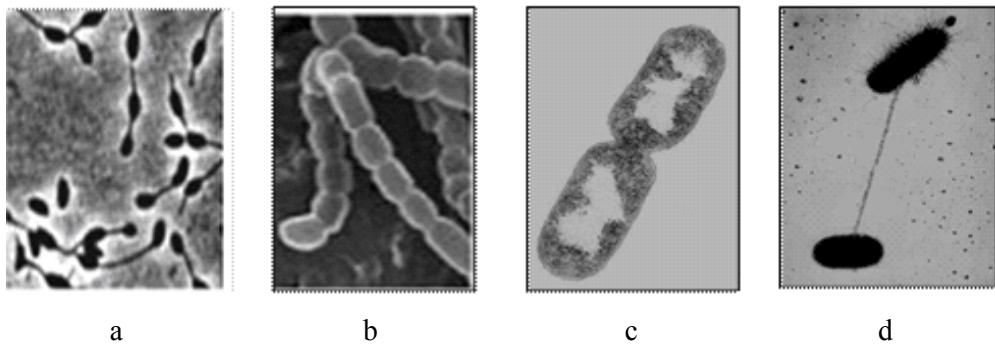
b) *Sinh sản bằng bào tử nảy chồi*: Ở một số vi khuẩn còn có hình thức sinh sản bằng ngoại bào tử (exospora) như ở vi khuẩn dinh dưỡng methane (*Methylosinus*) hay bằng bào tử đốt như ở xạ khuẩn *Streptomyces craterifer*. Vi khuẩn quang dưỡng màu đỏ (*Rhodomicrobium vannielii*) có hình thức phân nhánh và nảy chồi (hình 4.5).

Tất cả các bào tử sinh sản đều chỉ có các lớp màng, không có vỏ và không tìm thấy hợp chất calci dipicolinate.

– *Biến nạp (transformation)*: chuyển DNA tràn từ một tế bào vi khuẩn sang tế bào khác thông qua môi trường lỏng bên ngoài, hiện tượng này gồm cả vi khuẩn chết.

– *Tái nạp (transduction)*: chuyển DNA của virus, vi khuẩn, hay cả virus lẫn vi khuẩn, từ một tế bào sang tế bào khác thông qua thể thực khuẩn (*bacteriophage*).

– *Tiếp hợp (conjugation)*: chuyển DNA từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác thông qua cấu trúc protein gọi là pilus (lông giới tính – pili).



Hình 4.5. Một số hình thức sinh sản ở vi sinh vật nhân sơ.

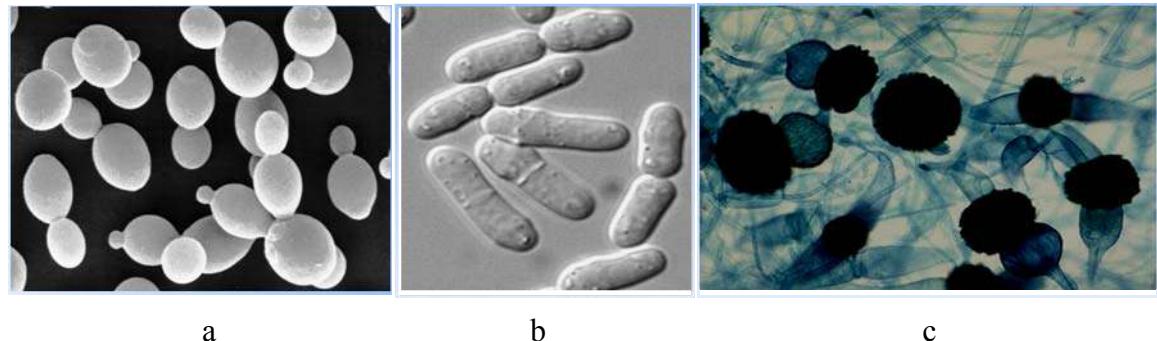
- a. Bào tử này chồi ở *Rhodomicromium sp.*; b. Bào tử đốt ở *Streptomyces*;
- c. Sinh sản phân đôi ở *Bacteria*; d. Sinh sản bằng tiếp hợp ở vi khuẩn *E.coli*.

Vi khuẩn, sau khi nhận được DNA từ một trong những cách trên, sẽ tiến hành phân chia và truyền bộ gene tái tổ hợp cho thế hệ sau. Nhiều vi khuẩn còn có plasmid chứa DNA nằm ngoài nhiễm sắc thể (*extrachromosomal DNA*). Dưới điều kiện thích hợp, vi khuẩn có thể tạo thành những khum thay được bằng mắt thường, dưới dạng khuẩn lạc S, R hay M.

4.3.5.2. Sinh sản ở vi sinh vật nhân thực

a) Sinh sản vô tính

- Sinh sản sinh dưỡng: Một khúc sợi nấm đặt vào MT thích hợp có thể phát triển rất nhanh. Phương pháp này được dùng để cấy các giống nấm.
- Bằng nảy chồi: tế bào chín tạo thành những chồi ở bên (1 hoặc 2, 3). Chồi lớn dần và sau đó thành một tế bào riêng. Kiểu sinh sản này điển hình cho các loài nấm men.



Hình 4.6. Một số hình thức sinh sản ở vi sinh vật nhân thực.

- a. Bào tử này chồi ở *S. cerevisiae*.; b. Phân đôi ở *Schizosaccharomyces*;
- c. Sinh sản cận hữu tính bằng hình thức tiếp hợp ở *Rhizopus*.

– Sinh sản bằng bào tử: Khác với nội bào tử vi khuẩn, bào tử nấm là loại tế bào sinh sản, rất đa dạng. Chúng được cấu tạo chủ yếu bởi hai lớp màng dày hemicellulose và chitin, không có acid dipicolinic.

– Sinh sản phân đôi như *Schizosaccharomyces*, tảo lục đơn bào (*Chlorophyta*), tảo mắt (*Euglenophyta*), trùng đê dày (*Paramecium*)...

b) Sinh sản hữu tính

Các tảo đơn bào: tảo lục (*Chlorophyta*), tảo mắt, trùng đế giày (*Paramecium caudatum*) sinh sản hữu tính bằng cách hình thành bào tử chuyển động hay hợp tử nhờ kết hợp giữa hai tế bào.

4.3.5.3. Khai thác và phòng ngừa của con người đối với vi sinh vật

Tốc độ sinh sản nhanh của vi sinh vật mang lại lợi ích to lớn, đồng thời cũng gây ra nhiều thảm họa cho con người.

a) *Với vi sinh vật có ích*: Con người đã sử dụng để sản xuất sinh khối giàu dinh dưỡng (protein, amino acid...); sản xuất nhiều loại sản phẩm khác nhau (bia, rượu, dấm, bột ngọt), thuốc chữa bệnh (chất kháng sinh, vitamin...), chất xúc tác (enzyme amylase, protease...); chế biến và bảo quản một số thực phẩm như tương, dưa, cà muối, nem chua, sữa chua cũng như thức ăn gia súc (rau, cỏ, củ quả ủ chua).

b) *Với vi sinh vật có hại*: Gây hư hỏng thực phẩm, các đồ dùng hàng hóa hoặc gây bệnh cho người, gia súc và cây trồng. Người ta phải tìm cách phát hiện sớm để có biện pháp phòng trừ, điều trị kịp thời.

4.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG

Khử trùng là để loại trừ hoặc tiêu diệt tất cả các hình thái sự sống bao gồm các tác nhân gây truyền nhiễm như nấm, vi khuẩn, virus, các dạng bào tử... hiện diện trên bề mặt, hay tồn tại trong canh trường, dung dịch thuốc, hoặc trong các hợp chất dùng trong nuôi cấy sinh học; môi trường (khu vực sản xuất), mẫu vật (nguyên liệu sử dụng), các dụng cụ thiết bị dùng trong (nhân giống, sản xuất thử, sản xuất chính và thu hồi sản phẩm)... bằng cách sử dụng các tác nhân lý – hóa nhằm ức chế hay giết chết, cuối cùng là loại bỏ các VSV không mong muốn.

Yêu cầu quan trọng nhất đối với phương pháp là phải đảm bảo vô trùng và càng ít hủy hoại vật liệu định khử trùng càng tốt.

4.4.1. Phương pháp dùng hóa chất

Đặc điểm của phương pháp này là dung dịch khử trùng tấn công vào cơ thể vi sinh vật sống để tiêu diệt chúng. Vì vậy, điều quan trọng là nồng độ thuốc khử trùng và thời gian ngâm phải đúng nếu không sẽ không có hiệu quả.

Để khử trùng có hiệu quả, thuốc sử dụng được trộn phải:

- Tiêu diệt hoặc ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật có hại.
- Không có hại cho dụng cụ, không khử hoạt tính các chất hữu cơ cần khử trùng.
- Pha đúng nồng độ.

a) Chlor hóa

Chlor là một chất oxy hóa mạnh, ở bất cứ dạng nào. Khi tác dụng với nước tạo ra nhiều phân tử acid hypochlorous HOCl có tác dụng khử trùng rất mạnh. Quá trình diệt

vi khuẩn xảy ra qua hai giai đoạn. Đầu tiên chất khử trùng khuếch tán xuyên qua lớp vỏ tế bào vi sinh, sau đó phản ứng với lớp men bên trong tế bào và phá hoại quá trình trao đổi chất dẫn đến sự diệt vong của tế bào.

Tốc độ của quá trình khử trùng tăng khi nồng độ của chất khử trùng và nhiệt độ nước tăng đồng thời phụ thuộc vào dạng không phân ly của chất khử trùng, vì quá trình khuếch tán qua vỏ tế bào xảy ra nhanh hơn quá trình phân ly. Tốc độ khử trùng bị chậm đi rất nhiều khi trong nước có các chất hữu cơ, cặn lơ lửng và các chất khử khác.

Để đảm bảo cho quá trình khử trùng đạt được hoàn toàn, sau khi khử trùng cần giữ lại một lượng chlor dư thích hợp. Do khả năng diệt trùng khác nhau của chlor tự do và chlor kết hợp, lượng chlor dư cần thiết cũng khác nhau. Lượng chlor đưa vào nước được xác định theo thực nghiệm.

b) Khử trùng bằng kali permanganate

Thuốc tím (Kali permanganate) là một chất oxy hóa có tác dụng oxy hóa chất hữu cơ, vô cơ và trong chủng mực có khả năng diệt khuẩn, vì vậy nó đồng nghĩa với sự giảm tiêu thụ oxy trong nước do quá trình hóa học và sinh học.

Các nhà sinh học thỉnh thoảng khuyến cáo việc sử dụng thuốc tím với liều lượng 2 – 6 mg/l đối với các ao nuôi có tình trạng thiếu oxy trầm trọng. Một số bệnh của cá được chữa bằng cách sử dụng thuốc tím đối với cá trong các bể nhốt hoặc trong ao nuôi. Nồng độ thuốc tím ít khi vượt 4 – 8 mg/l trong ao nuôi, có thể cao hơn nhưng với thời gian tiếp xúc ngắn trong bể nhốt. Thuốc tím được dùng để khử rotenone (thuốc diệt cá) và antimycin là chất độc cho cá.

c) Ozone hóa

Ozone là một chất khí màu xanh nhạt (ở điều kiện chuẩn). Ở trong nước, ozone phân hủy rất nhanh thành oxy phân tử và nguyên tử. Ozone có khả năng hoạt hóa mạnh hơn chlor nên diệt trùng mạnh hơn.

Dộ hòa tan của ozone gấp 13 lần của oxy. Khi vừa cho vào trong nước, khả năng tiệt trùng là rất ít, khi ozone đã hòa tan đủ liều lượng, ứng với hàm lượng đủ oxy hóa hữu cơ và vi khuẩn trong nước, lúc đó tác dụng khử trùng mạnh gấp 3100 lần so với chlor, thời gian tiệt trùng xảy ra trong khoảng 3 – 8 giây.

Liều lượng cần thiết cho nước ngầm là 0,75 – 1 mg/l; 1,0 – 3,0 mg/l nước mặt; sau bể lắng đợt 2 trong xử lý nước thải từ 5 – 15 mg/l.

Hiện nay có nhiều máy tạo khí ozone gọn nhẹ tiện lợi cho việc khử trùng phòng học, phòng ngủ, phòng bảo quản thức ăn tươi sống.

d) Khử trùng bằng hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide là một acid rất yếu: $\text{H}_2\text{O}_2 = (\text{đảo ngược}) = \text{H} \text{HO}_2^-$ ($K_a = 2,4 \times 10^{-12}$). Hydrogen peroxide có thể giết chết vi khuẩn đường ruột, vi khuẩn sinh mủ, nấm men gây bệnh, thường được sử dụng để khử trùng bề mặt. Quá trình oxy hóa với hydrogen

peroxide, nhưng nồng độ hydrogen peroxide y tế $\leq 3\%$, lau bì mặt vết thương sẽ có cảm giác nóng, bì mặt bị oxy hóa màu trắng và có ga, rửa với nước vào nó, hơn 3 – 5 phút khôi phục lại màu sắc ban đầu.

Trong việc chuẩn bị phòng thí nghiệm, hydrogen peroxide có thể được sử dụng để chuẩn bị oxy nhanh chóng và thuận tiện, nhưng chi phí cao hơn, không được sử dụng trong việc chuẩn bị sản xuất công nghiệp hàng loạt.

e) Các hóa chất thông dụng khác

– Iod (iodine) trong cồn 70%: Sử dụng sát trùng da trước khi mổ, trước khi tiêm và làm các thủ thuật.

– Hibitan 0,05% trong cồn 70% để khử trùng da: Hibitan 1% để khử trùng dụng cụ.

– Chloramine:

+ Dùng khi có bệnh nhân viêm gan virus hoặc bại liệt.

+ Chloramine 5% khử trùng phòng và dụng cụ; Chloramine 0,5% khử trùng da.

– Phenol: Có tác dụng chống lại hầu hết các loại vi khuẩn, đối với virus hiệu quả không chắc chắn. Phenol 1% khử trùng phòng và trang thiết bị từ các ca nhiễm khuẩn bởi virus viêm gan B; Phenol 2% để khử trùng dụng cụ. Phenol gây ăn mòn kim loại, không dùng cho các vật thể sống và dụng cụ cấu tạo bằng cao su.

– Dùng hypochlorite calci dạng bột $\text{Ca}(\text{ClO})_2$: hòa tan thành dung dịch 3 – 5%, rồi định lượng cho vào bể tiếp xúc.

– Dung dịch chloramine 0,02% có thể ngăn cản được tụ cầu vàng và trực khuẩn đường ruột phát triển. Các vi khuẩn này có thể chết ở dung dịch 0,5% trong 1 phút. Bào tử trực khuẩn than sau một giờ ở dung dịch 3% cũng bị tiêu diệt.

Hiệu quả khử khuẩn của chloramine cũng giống như trường hợp dùng khí clo khí, nghĩa là cũng phụ thuộc vào pH, nhiệt độ, tạp chất có trong nước. Sử dụng viên rất tiện lợi và dễ dùng. Các viên này thường có 20 – 40% lượng chlor hoạt động. Thời gian khử khuẩn khoảng 20 – 30 phút. Các viên này cần giữ ở điều kiện khô và mát. Dùng thuận lợi trong các điều kiện khẩn cấp như lũ lụt, chiến tranh, phòng chống dịch bệnh... Tuy nhiên, chi phí cao hơn khi dùng chlor bình thường và nước cũng có dư vị mùi (mùi chlor), dễ hình thành chlor hữu cơ.

4.4.2. Khử trùng bằng các phương pháp vật lý

Để khử trùng, tiệt trùng bằng phương pháp vật lý, người ta sử dụng các hình thức sau đây:

a) Phương pháp sấy khô

– Phương pháp sấy khô thường được áp dụng tiệt khuẩn cho các dụng cụ chịu được nhiệt độ cao.

- Nguyên lý: trong tủ sấy nhiệt độ cao và khô làm oxy hóa màng tế bào VSV.
- Nhiệt độ và thời gian tiệt khuẩn:
 - + Nhiệt độ 180 °C, thời gian 60 phút.
 - + Nhiệt độ 170 °C, thời gian 2 giờ.

Ưu điểm: dụng cụ sắc nhọn không bị cùn, tiệt khuẩn được các dụng cụ bằng thủy tinh, dầu mỡ, phấn bột.

Nhược điểm: thời gian tiệt khuẩn dài, không áp dụng được cho dụng cụ bằng vải và cao su, nhựa.

b) Khử trùng bằng hơi nước bao hòa ở nhiệt độ và áp suất cao

Theo phương pháp này, người ta tạo ra một môi trường có nhiệt độ cao từ 115 °C – 135 °C với áp suất dư từ 0,5 – 2,0 bar để nén và tăng va đập vào vi khuẩn, virus nhằm tiêu diệt chúng nhanh.

Đây là phương pháp có ưu điểm hơn cả, hiệu quả tiệt trùng cao, không làm hủy hoại vật hấp, thời gian khử trùng ngắn...

Nhược điểm là do thiết bị chịu áp lực nên vận hành phức tạp, đòi hỏi người vận hành thiết bị phải thực hiện đúng quy trình kỹ thuật và quy phạm an toàn do Nhà nước quy định.

c) Khử trùng bằng tia và sóng điện từ

Ở phương pháp này, người ta dùng tia và sóng điện từ thích hợp để kìm hãm sự phát sinh và phát triển của vi khuẩn, với cường độ đủ lớn có thể tiêu diệt chúng. Thông dụng người ta sử dụng đèn cực tím tạo ra chùm tia có bước sóng quanh bước sóng 260 nm mà ta vẫn quen gọi là đèn khử trùng.

Hiệu quả tiệt trùng bị hạn chế, nó chịu ảnh hưởng của nguồn điện, nhiệt độ, độ ẩm môi trường và thể tích khối không khí cần khử trùng.

d) Dùng nén lọc vi khuẩn hoặc màng lọc

Một số chất hữu cơ như huyết thanh, albumin trong môi trường dễ bị biến tính khi khử trùng bằng nhiệt độ cao nên phải khử trùng bằng cách lọc qua các dụng cụ lọc vi khuẩn.

4.4.3. Khử trùng bằng phương pháp phối hợp

Đây là phương pháp phối hợp giữa hai phương pháp hóa học và phương pháp vật lý để nâng cao hiệu quả tiệt trùng. Ví dụ: để khử trùng trong các phòng mổ ta có thể kết hợp vừa sử dụng phương pháp hóa học và vừa dùng đèn khử trùng. Hoặc với những dụng cụ không chịu được nhiệt độ cao trên 80 °C, người ta dùng nồi hấp ở nhiệt độ thấp kết hợp hóa chất là formaldehyde. Do mỗi phương pháp có những ưu nhược điểm riêng, phương pháp nọ hỗ trợ phương pháp kia nên hiện nay các phương pháp này vẫn đang được sử dụng để khử trùng, tiệt trùng các vật dụng trong bệnh viện, vì vậy chúng ta cần nghiên cứu và sử dụng chúng để phát huy hiệu quả của từng loại thiết bị. Tùy đối tượng cần tiệt trùng mà chọn phương pháp thích hợp để hiệu quả tiệt trùng cao.

4.4.4. Một số phương pháp khác

a) Khử trùng bằng hấp Pasteur

Năm 1860, Louis Pasteur đề xuất phương pháp khử trùng mà ngày nay được gọi là cách khử trùng Pasteur (pasteurization). Đun nóng môi trường lên 63°C (145°F) trong 30 phút hoặc 73°C (163°F) trong 15 giây trong điều kiện không có không khí. Nhờ phương pháp này, các thực phẩm có thể lưu trữ được lâu hơn mà không bị hư thối. Cách này có tác dụng khử trùng các vi sinh vật không có bào tử và chỉ áp dụng cho các nguyên liệu dễ biến tính ở nhiệt độ cao như sữa, bia, rượu, nước trái cây...

b) Khử trùng theo phương pháp Tyndall

Các môi trường dinh dưỡng, nước, các ống bằng cao su và một số dụng cụ... dễ bị hỏng khi khử trùng bằng sức nóng khô ở nhiệt độ cao. Vì vậy, cần phải khử trùng bằng cách đun cách thủy ở nhiệt độ $70 - 80^{\circ}\text{C}$ mỗi lần 30 – 60 phút, lặp lại 3 lần trong 3 ngày kế tiếp nhau.

Giải thích: Lần đun thứ nhất trong 30 – 60 phút, làm chết các tế bào sinh dưỡng, nhưng bào tử còn sống. Sau đó để môi trường đã khử trùng vào tủ âm $28 - 30^{\circ}\text{C}$, ở điều kiện này lại có môi trường tốt, các bào tử sẽ nảy mầm. Trong lần khử trùng thứ hai này, các tế bào nảy mầm lại bị tiêu diệt. Để đảm bảo hoàn toàn vô trùng, ta tiếp tục khử trùng lần thứ ba trong ngày thứ ba kế tiếp.

4.5. CÁC PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN CHỦNG GIỐNG VI SINH VẬT

4.5.1. Cây truyền thường xuyên trên thạch nghiêng hoặc trích sâu vào thạch

Sau khi đã sinh trưởng vi khuẩn được giữ trong tủ lạnh $+4^{\circ}\text{C}$.

Phương pháp này đơn giản nhất và thường được sử dụng nhưng lại kém hiệu quả nhất và bộc lộ nhiều nhược điểm như sau:

- Dễ bị tạp nhiễm và dễ dẫn đến mất chủng giống gốc;
- Mất hay nhầm lẫn nhẫn hiệu giữ các chủng trong quá trình bảo quản;
- Phải nghiên cứu và theo dõi thời gian cây truyền thích hợp đối với các chủng bảo quản;
- Tốn nhiều công sức để cây truyền;
- Giống gốc có thể mất do sai sót khi dùng môi trường cây truyền không thích hợp;
- Chủng vi sinh vật cây truyền dễ bị thay đổi các đặc điểm sinh học do đột biến xuất hiện sau mỗi lần cây truyền.

4.5.2. Các phương pháp bảo quản vi sinh vật khác

- Bảo quản dưới dầu vô trùng: dầu paraffin vừa ngăn cản môi trường khô vừa làm giảm trao đổi chất gây cản trở sự xâm nhập của oxy.

– Bảo quản trong cát hoặc đất sét vô trùng: do cấu trúc lý – hóa cát và đất sét đều là những vật chất tốt mang các tế bào vi sinh vật, chủ yếu là các bào tử.

– Đóng khô: là phương pháp hoàn thiện và có hiệu quả nhất. Vi khuẩn được trộn với môi trường thích hợp (sữa, huyết thanh...) rồi làm lạnh và làm khô nhờ băng khô.

– Bảo quản trong glycerol (10%) và giữ trong tủ lạnh sâu (-60°C hay -80°C): đây là phương pháp rất thích hợp nhưng cần mua được loại ống nhựa chịu nhiệt (khi khử trùng).



Hình 4.7. Đóng khô vi sinh vật.

– Bảo quản trong nitơ lỏng là phương pháp vạn năng hơn cả. Phương pháp này thích hợp với nhiều đối tượng vi sinh vật khác nhau như vi khuẩn, nấm sợi, nấm men, virus, tảo và cả các dòng tế bào động vật. Tuy nhiên, phương pháp này cũng bộc lộ một số nhược điểm như đầu tư kinh phí cho thiết bị và điện, nitơ lỏng hoặc rủi ro như cháy nổ... Đặc biệt phương pháp này không thích hợp với các chủng vi sinh vật thường xuyên dùng đèn. Nói chung, phương pháp này thường được dùng với các chủng vi sinh vật có những đặc tính quý mà không thích hợp với phương pháp đóng khô.

4.6. HÔ HẤP, CHUYỂN HÓA VÀ LÊN MEN CỦA VI SINH VẬT

4.6.1. Hô hấp ở vi sinh vật

Hô hấp là sự oxy hóa các chất hữu cơ để tạo năng lượng dưới dạng ATP. Tùy từng chủng giống VSV khác nhau mà oxy hóa, phân hủy các hợp chất khác nhau. Đối với VSV hiếu khí chúng sử dụng oxy không khí để oxy hóa các hợp chất hữu cơ và vô cơ đến CO_2 và H_2O .

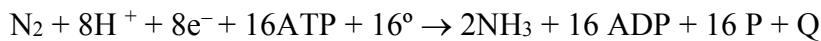
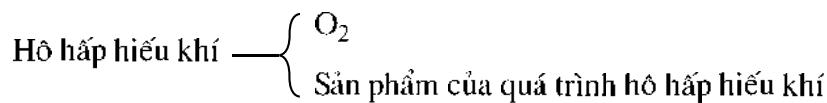
Đối với các chủng giống VSV kỵ khí, quá trình oxy hóa sinh năng lượng không kèm theo việc liên kết với oxy của không khí mà là oxy phân tử và oxy liên kết: NO_3 , CO_2 , SO_3 ... Trong điều kiện kỵ khí, nếu là hợp chất hữu cơ thì chất hữu cơ vừa làm nhiệm vụ

chất nhận vừa làm nhiệm vụ chất cho electron. Kết quả một phần cơ chất bị khử và một phần khác bị oxy hóa.

Khác với các sinh vật khác, (1) quá trình hô hấp ở VSV không có bộ máy hô hấp chuyên trách, sự hô hấp diễn ra trên toàn bộ tế bào; (2) hô hấp có thể cần oxy như động vật nhưng có thể không cần oxy (hô hấp khí); (3) cơ chất để oxy hóa có thể là chất hữu cơ và cũng có thể là chất vô cơ; (4) một phần năng lượng của quá trình oxy hóa được chuyển thành nhiệt năng làm nóng môi trường. Tùy từng loài VSV mà chúng sử dụng các hình thức hô hấp khác nhau.

4.6.1.1. Cơ chế của hô hấp hiếu khí ở vi sinh vật

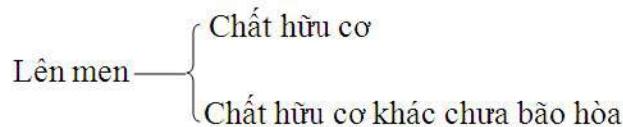
Hô hấp hiếu khí là quá trình hô hấp xảy ra nơi có oxy, sản phẩm cuối cùng là CO₂ và nước, năng lượng giải phóng được tích lũy trong ATP.



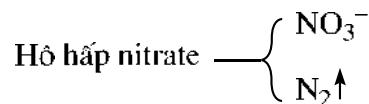
VSV hô hấp hiếu khí: *Azotobacter, Bacillus, Rhizobium, Micrococcus...*

4.6.1.2. Cơ chế của hô hấp ky khí ở vi sinh vật

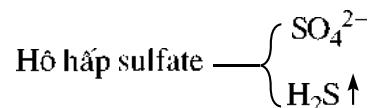
Hô hấp ky khí là quá trình hô hấp xảy ra nơi không có oxy, sản phẩm cuối cùng là các sản phẩm trao đổi chất (ethanol, acid lactic...), CO₂ và nước, ATP.



Vi sinh vật: *Saccharomyces, Lactobacillus, Streptococcus...*



Vi sinh vật: *Nitrosomonas, Nitrobacter, Spirillum denitrificans...*



Vi sinh vật: *Vibrio denitrificans, Chlorobium, Spirillum denitrificans...*

4.6.2. Chuyển hóa của vi sinh vật

Vi sinh vật rất nhỏ bé nhưng sinh sản phát triển nhanh chóng, do chúng có hệ thống enzyme phức tạp. Mỗi loại vi sinh vật có một hệ thống enzyme riêng, nhờ có hệ thống enzyme này mà VSV có thể dinh dưỡng, hô hấp và chuyển hóa để sinh sản và phát triển.

– *Sự chuyển hóa đường:* Đường là một chất vừa cung cấp năng lượng vừa cung cấp nguyên liệu để cấu tạo. Chuyển hóa đường tuân theo một quá trình phức tạp từ polyozid đến ozid qua glucose đến pyruvate: lactose → glucose → esteglucose-6-phosphoric → pyruvate. Pyruvate đóng vai trò trung tâm trong quá trình chuyển hóa các chất đường.

– *Chuyển hóa chất đạm:* Các chất đạm cũng được chuyển hóa theo một quá trình phức tạp từ albumin đến amino acid.

Albumin → protein → peptone → polypeptid → amino acid

– *Các chất được hợp thành:* Ngoài những sản phẩm chuyển hóa trong quá trình đồng hóa trên và ngoài các chất là thành phần của bản thân VSV, còn có một số chất được tạo thành:

+ Độc tố: phần lớn các VSV gây bệnh trong quá trình sinh sản và phát triển đã tổng hợp nên độc tố.

+ Kháng sinh: một số VSV tổng hợp được chất kháng sinh, chất này có tác dụng úc chế hoặc tiêu diệt chọn lọc các VSV khác loại.

+ Sắc tố: một số VSV có khả năng sinh ra các sắc tố như màu vàng của tụ cầu, màu xanh của trực khuẩn mủ xanh, màu đen của nấm Aspergillus niger...

+ Vitamin: nhiều loại VSV tổng hợp được các loại vitamin E, K...

4.6.3. Một số quá trình lên men của vi sinh vật

Lên men là sự oxy hóa không trọn vẹn các chất hữu cơ trong điều kiện kỵ khí mà chất cho và nhận điện tử đều là chất hữu cơ.

4.6.3.1. Quá trình lên men rượu

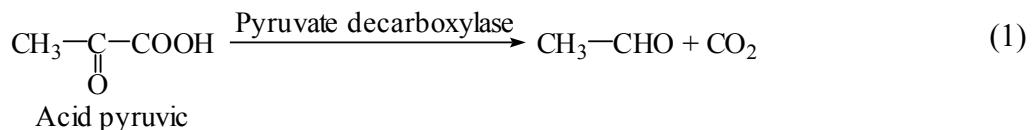
Dưới tác dụng của một số loại VSV có enzyme zymase, trong điều kiện kỵ khí đường glucose chuyển hóa thành rượu ethylic và CO₂, đồng thời giải phóng năng lượng. Quá trình này gọi là quá trình lên men rượu ethylic.

Các vi sinh vật chủ yếu: *Saccharomyces cerevisiae*, *Sac. vini*, *Sac. Carlsbergensis*, *Sac. uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe*, vi khuẩn *Zygomonas mobilis*...

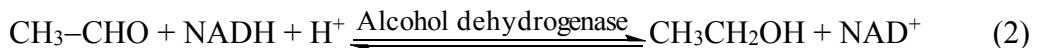
a) Cơ chế

Lên men rượu là quá trình phân giải kỵ khí đường dưới tác dụng của enzyme vi sinh vật đặc hiệu.

Trong sự lên men rượu, đầu tiên pyruvic acid được tạo thành qua sơ đồ Embden – Mayerhoff – Parnas, bị decarboxyl hóa tạo thành acetaldehyde và CO₂ nhờ xúc tác của pyruvate decarboxylase.



Sau đó acetaldehyde bị khử thành rượu ethylic dưới tác dụng xúc tác của alcoholdehydrogenase của nấm men:



Ở đây NADH tạo thành trong phản ứng oxy hóa glyceraldehyde-3-P của quá trình đường phân đóng vai trò chất cho hydro, còn acetaldehyde là chất nhận.

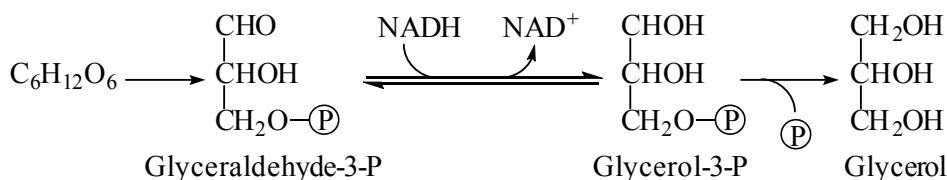
Tùy điều kiện của môi trường, sự lên men rượu có thể tiến hành theo các kiểu như sau.

b) Các kiểu lên men rượu

– *Sự lên men rượu trong điều kiện bình thường:*

Xảy ra khi pH = 4 – 5 và có thể chia làm hai thời kỳ:

+ *Thời kỳ cảm ứng:* Trong thời kỳ này, lượng acetaldehyde tạo thành theo phản ứng (1) còn ít, khi đó glyceraldehyde-3-P tạo thành được chuyển từ NADH tới acetaldehyde glycero-3-P. Chất này bị khử gốc P nhờ enzyme phosphatase tạo thành glycerol:



Vậy glycerol là sản phẩm phụ của quá trình lên men rượu trong môi trường acid.

+ *Thời kỳ tĩnh:*

Khi lượng acetaldehyde đã đạt tới mức nào đó thì chất này tiếp nhận hydro từ NADH để chuyển thành rượu etylic theo phản ứng (2):



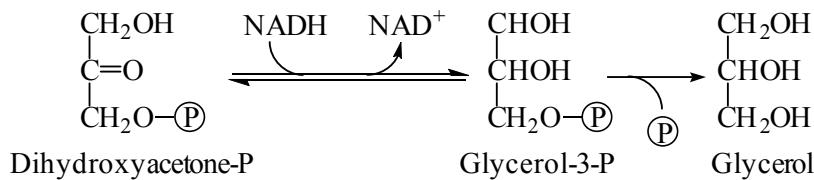
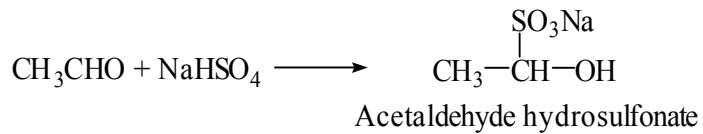
Phương trình tổng quát của sự lên men rượu bình thường như sau:



– *Lên men rượu và sự tạo thành glycerol:*

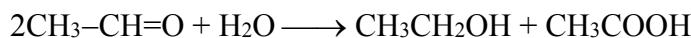
Để tăng cường sự tạo thành glycerol (để sản xuất glycerol hoặc tạo vị cho đồ uống có rượu), trong môi trường có bisulfate.

Nguyên tắc của phương pháp này là chuyển acetaldehyde thành acetaldehyde hydrosulfonate khó tan bằng cách bổ sung NaHSO₃ vào môi trường. Khi đó, NADH cho dihydroxyacetone-P tạo thành glycerol-3-P, chất này bị khử phosphate để tạo thành glycerol dưới tác dụng của enzyme phosphatase:

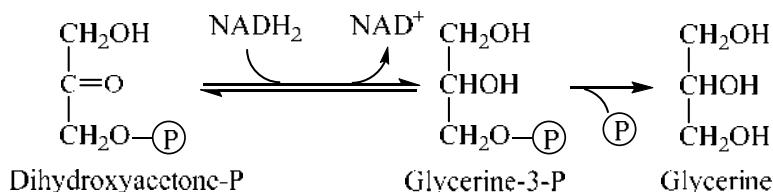


– *Sự lên men rượu trong môi trường kiềm:*

Trong quá trình lên men kiềm này, acetaldehyde được loại bỏ nhờ phản ứng tạo thành ethanol và acid acetic trong điều kiện môi trường kiềm:



Khi đó NADH chuyển hydro cho dihydroxyacetone-P tạo thành glycerol-3-P, chất này bị khử phosphate để tạo thành glycerol nhờ enzyme phosphatase:



+ *Sự ức chế lên men rượu khi có mặt oxy:*

Sự lên men xảy ra mạnh mẽ trong điều kiện kỵ khí. Khi có oxy, quá trình lên men bị ức chế và chuyển sang cơ chế hô hấp. Sự ức chế lên men khi có mặt oxy gọi là hiệu ứng Pasteur. Trong quá trình này, ATP được tổng hợp mạnh mẽ nhờ phosphoryl hóa oxy hóa kết hợp với quá trình vận chuyển proton và electron qua dây hô hấp tới oxy. Kết quả là trạng thái tích lũy năng lượng của tế bào tăng lên, vi sinh vật chỉ cần một lượng glucose không nhiều cũng đủ để duy trì sự sống và phát triển của chúng.

Hiệu ứng Pasteur là một cơ chế điều hòa quan trọng đối với quá trình lên men. Trong thực tế, khi sản xuất sinh khối thì người ta cho nấm men phát triển trong điều kiện thoáng khí, còn khi cần thúc đẩy sự lên men thì cần giữ môi trường trong điều kiện kỵ khí.

– *Sự tạo thành dầu khét (dầu fusel):*

Dầu khét là sản phẩm phụ của quá trình lên men. Thành phần chủ yếu là các rượu cao phân tử như rượu propylic, amylic, isoamylic, butylic, isobutylic, tyrosol... Chúng là những cấu tử tạo nên mùi thơm đặc trưng cho các sản phẩm lên men. Ngoài rượu cao phân tử, các sản phẩm khác của quá trình như amino acid, acid béo... là chất dinh dưỡng và nguyên liệu cho các quá trình tổng hợp của tế bào vi sinh vật.

c) *Ứng dụng quá trình lên men rượu*

Sản xuất rượu, bia, các loại nước giải khát, lên men làm nở bột mì; sản xuất glycerol, ѿ men thức ăn gia súc,...

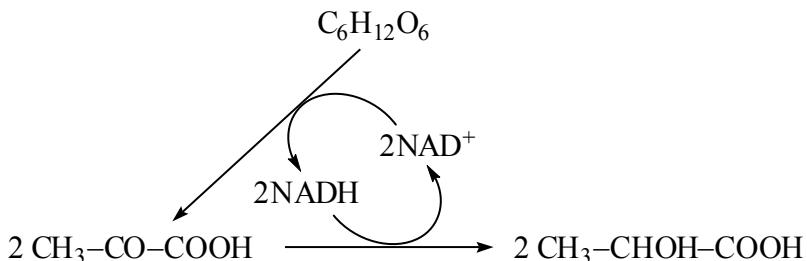
4.6.3.2. Quá trình lên men lactic

Quá trình chuyển hóa từ đường glucose dưới tác dụng của enzyme VSV trong điều kiện kỹ khí thành acid lactic và một số acid hữu cơ khác, đồng thời giải phóng năng lượng được gọi là quá trình lên men lactic.

Cơ chế: Có hai quá trình lên men lactic khác nhau là lên men lactic đồng hình và lên men lactic dị hình.

a) *Lên men lactic đồng hình*

Trong quá trình lên men lactic đồng hình, glucose sẽ được chuyển hóa theo đường phân (Embden – Mayerhof – Parnas (EMP)). Sau đó acid pyruvic sẽ biến đổi thành acid lactic dưới tác dụng của enzyme lactatedehydrogenase. Lượng acid lactic tạo thành chiếm 90% – 98% trong tổng số các sản phẩm lên men. Sự lên men đồng hình ở vi khuẩn thường gặp ở các chi: *Streptococcus* (*S. cremoris*, *S. lactis*, *S. thermophilus*) và *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. cucumeris*, *L. plantarum*...)



b) Lên men lactic di hình

Vi khuẩn lên men lactic dị hình thiếu các enzyme chủ yếu của đường phân là aldolase và triose phosphateisomerase. Đoạn phân giải glucose đầu tiên chỉ xảy ra qua con đường pentose phosphate, tức là qua glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate và ribulose-5-phosphate. Chất này nhờ epimerase được chuyển thành xilulose-5-phosphate và nhờ transketolase được biến đổi thành glyceraldehyde-3-phosphate.

Khi lên men, các vi khuẩn nhóm này chỉ tạo ra 60% acid lactic, phần còn lại là acid acetic, rượu ethylic, glycerol và một vài sản phẩm khác... Gồm các loài: *L. brasicar fermentatae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *E. coli*...

Các tế bào *Leuconostoc mesenteroides* không sinh trưởng và được rửa sạch đã lên men glucose thành lactate, ethanol và CO₂ theo một tỷ lệ gần như tương đương.



Ở các cơ thể này acetyl-phosphate bị khử thành acetyl-CoA, acetaldehyde bị khử thành ethanol. Các vi khuẩn lên men dị hình khác chuyển một phần hoặc toàn bộ

acetylphosphate thành acetate, trong đó liên kết phosphate giàu năng lượng được chuyển sang ADP để tạo thành ATP.

Dihydro thura trong trường hợp này được chuyển cho glucose làm xuất hiện mannitol. Glyceraldehyde-3-phosphate được biến đổi thành piruvate rồi thành lactate. Ribose được *L.mesenteroides* lên men thành lactate và acetate.

* Lên men lactic dị hình ở *Bifidobacterium*. Vi khuẩn lactic dị hình *Bifidobacterium bifidum* có dạng chữ V hay chữ Y (*bifidus* tiếng Hy Lạp có nghĩa là bị chia đôi, bị phân cắt), là thành viên trong khu hệ đường ruột của trẻ sơ sinh, trước hết là các trẻ nuôι bằng sữa mẹ. Vi khuẩn này cần N-acetylglucosamine chỉ có trong sữa người mà không có trong sữa bò. Các đại diện thuộc chi *Bifidobacterium* là những vi khuẩn kỵ khí nghiêm ngặt, không chịu khí và cần một khí quyển chứa CO₂ (10% CO₂) để sinh trưởng. *Bifidobacterium* chuyển hóa glucose theo phương trình:



c) *Ứng dụng của lên men lactic*

Sản xuất acid lactic, chế biến sữa chua, ủ chua thức ăn cho gia súc...

4.6.3.3. Lên men butyric

Trong tự nhiên, dưới tác dụng của một số VSV kỵ khí, đường glucose được chuyển hóa để cho acid butyric gọi là quá trình lên men butyric.

Cơ chế:

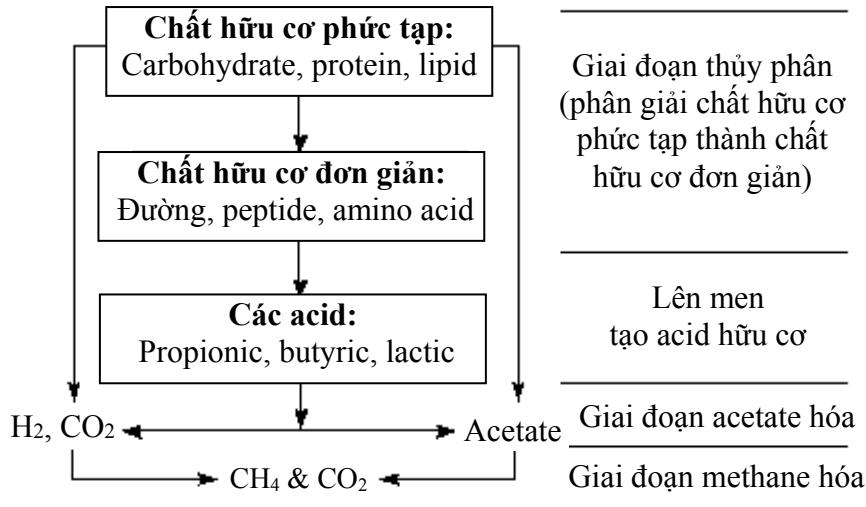


Vi sinh vật lên men butyric: Chủ yếu thuộc chi *Clostridium*. Đây là loại vi khuẩn Gram dương, kỵ khí bắt buộc có khả năng sinh bào tử khi môi trường sống bất lợi. Khi mang bào tử té bào thường có hình thoi, hay hình dùi trống. Phần lớn các loài *Clostridium butyricum*, *Clos. pasteurianum*, *Clos. lactoacetophilum* đòi hỏi cao với điều kiện kỵ khí, trừ một số loài như *Clos. pecctinovorum*, *Clos. hystolyticum*.

Ứng dụng: Vi khuẩn lên men butyric tham gia tích cực vào quá trình phân giải xác hữu cơ trong tự nhiên. Nhiều loài *Clostridium* được ứng dụng trong công nghiệp để sản xuất các loại hóa chất quan trọng như acetone, butanol, acid butyric, isopropanol...

4.6.3.4. Lên men methane

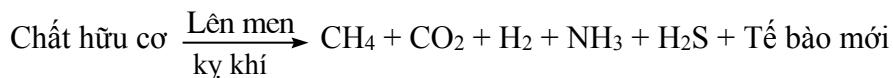
Dưới tác dụng của một số VSV kỵ khí, một số hợp chất hữu cơ sẽ bị phân hủy, đồng thời giải phóng khí CH₄ gọi là quá trình lên men methane.



Hình 4.8. Sơ đồ quá trình vi sinh hóa lên men methane.

a) Sơ đồ quá trình vi sinh hóa lên men methane (hình 4.8)

Phương trình phản ứng hóa sinh trong điều kiện kỵ khí có thể biểu diễn như sau:



b) Quá trình các phản ứng sinh hóa

Quá trình các phản ứng sinh hóa xảy ra trong quá trình sản xuất biogas (CH₄) có thể được phân làm bốn giai đoạn:

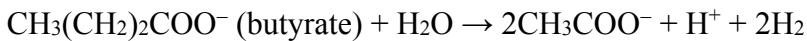
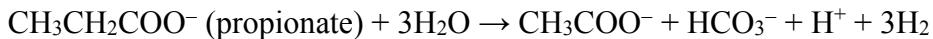
– Giai đoạn 1 (Giai đoạn thủy phân): Phân mới nạp vào bể phân hủy, bắt đầu quá trình lên men vi sinh. Dưới tác dụng của các loại men khác nhau do nhiều loại vi sinh vật tiết ra (vi khuẩn *Clostridium*, *bipiclobacterium*, trực khuẩn Gram âm không sinh bào tử, *Staphylococcus*...), các chất hữu cơ phức tạp như carbohydrate, protein, lipid dễ dàng bị phân hủy thành các chất hữu cơ đơn giản, dễ bay hơi như ethanol, các acid hữu cơ như acid acetic, acid butyric, acid propionic, acid lactic.... và các khí CO₂, H₂ và NH₃.

Khi phân tươi mới nạp vào, sự lên men kỵ khí được diễn ra nhanh chóng, các “túi khí” được tạo thành, như là chiếc phao, làm cho nguyên liệu nhẹ và nổi lên, thành váng ở lớp trên.

– Giai đoạn 2 (Giai đoạn acid hóa): là giai đoạn lên men, hay giai đoạn đầu của quá trình bán phân hủy, nhờ các vi khuẩn *Acetogenic bacteria* (vi khuẩn tổng hợp acetate), chuyển hóa các carbohydrate và các sản phẩm của giai đoạn 1 như albumoz pepide, glycerol và các acid hữu cơ thành các acid có phân tử lượng thấp hơn như C₂H₅COOH, C₃H₇COOH, CH₃COOH, một ít hydro và khí CO₂.

Quá trình này sản sinh các sản phẩm lên men tạo mùi hôi thối như H₂S, indole, scatol..., pH của môi trường dịch phân hủy < 5.

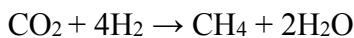
– Giai đoạn 3 (Giai đoạn acetate hóa): Các vi khuẩn tạo methane chưa thể sử dụng được các sản phẩm của các giai đoạn trước (1 và 2) để tạo thành methane, nên phải phân giải tiếp tục để tạo thành các phân tử đơn giản nhỏ hơn nữa (trừ acid acetic), nhờ các vi khuẩn acetate hóa. Sản phẩm của quá trình phân giải này gồm acid acetic, H₂, CO₂.



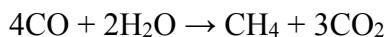
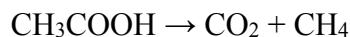
Giai đoạn này nhờ các vi khuẩn acetate hóa phân giải các sản phẩm của giai đoạn trước tạo nhiều sản phẩm H₂ và nó được vi khuẩn methane sử dụng làm chất cho điện tử để khử CO₂ hình thành methane (CH₄), bắt đầu giai đoạn phân hủy. Lúc này các chất bã hữu cơ phân hủy mủn ra thành các phân tử nhỏ, lơ lửng trong dịch thải. pH của môi trường dịch bể phân hủy chuyển sang kiềm và tối ưu ở khoảng 6,8 – 7,8.

– Giai đoạn 4: hình thành khí methane. Đây là giai đoạn cuối cùng của quá trình phân giải kỹ tạo thành hỗn hợp sản phẩm, trong đó khí methane chiếm phần lớn. Quá trình hình thành khí methane xảy ra đồng thời, bằng ba con đường:

+ Nhờ vi khuẩn *Hydrogenotrophic methanogen* sử dụng cơ chất cho điện tử là hydro để khử CO₂ thành CH₄:

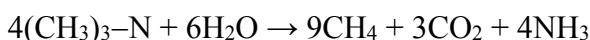
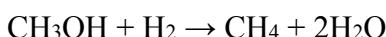


+ Nhờ vi khuẩn acetotrophic methanogen chuyển hóa acetate thành methane và CO₂. Khoảng 70% lượng methane sinh ra bằng con đường này.



Vi sinh vật lên men methane:

γ) Nhờ vi khuẩn methylotrophic methanogen phân giải cơ chất chứa nhóm methyl:



Trong các nghiên cứu, người ta thấy rằng trong ba giai đoạn đầu (thủy phân, acid hóa và acetic hóa) thì:

– Lượng COD hầu như không giảm. COD chỉ giảm trong giai đoạn methane hóa, giai đoạn cuối cùng của quá trình phân giải kỹ khí;

– Ngoài các sản phẩm chính là methane, còn có các sản phẩm NH₃, H₂S, indole, scatol... gây mùi thối.

Như vậy, các sản phẩm gây mùi thối chỉ tạo ra trong quá trình lên men và bán phân hủy chất hữu cơ, nếu bị đẩy ra ngoài bể phân hủy, kéo mùi thối ra cùng, sẽ là nguyên nhân gây thối và ô nhiễm môi trường thứ cấp.

Vi sinh vật lên men methane: *Methanobacter* và *Synthrophobacter*, *Sarcina metha-nica*, *Methanoplanus endosymbiosus*, các loài *Methanobrevibacter* và *Methanobacterium formicicum*....

Ứng dụng: Điều chế khí methane làm khí đốt thắp sáng, chạy máy phát điện. Một số vi khuẩn lên men methane có khả năng tích lũy khá nhiều vitamin B₁₂.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Trong hoạt động sống, vi sinh vật luôn luôn hấp thụ các chất từ môi trường, đồng thời luôn thải các chất không cần thiết ra ngoài môi trường. Công việc này do màng tế bào đảm nhận.

Nguồn dinh dưỡng của vi sinh vật chủ yếu là C, N và các chất dinh dưỡng khoáng, chúng thực hiện theo hai kiểu dinh dưỡng đó là dinh dưỡng quang năng và dinh dưỡng hóa năng. Tùy thuộc vào nguồn carbon mà vi sinh vật được chia thành tự dưỡng hay dị dưỡng. Nếu nguồn carbon là chất vô cơ thì gọi là tự dưỡng, còn nếu nguồn carbon là chất hữu cơ thì gọi là dị dưỡng.

Nghiên cứu sự sinh trưởng, sinh sản của vi sinh vật giúp chúng ta có cơ sở lý luận để vận dụng vào thực tiễn sản xuất các chế phẩm sinh học, nhằm góp phần cải tạo và bảo vệ môi trường.

Vi sinh vật có hai kiểu hô hấp, đó là hô hấp hiếu khí và hô hấp kỵ khí, tùy thuộc vào từng chủng giống khác nhau, mà có kiểu hô hấp khác nhau.

Vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong lên men, tùy theo sản phẩm tích lũy chủ yếu và điển hình được dùng để gọi tên. Ví dụ sản phẩm lên men chủ yếu là rượu ethylic thì gọi là lên men rượu ethylic.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Các kiểu dinh dưỡng của vi sinh vật?
2. Các cơ chất dinh dưỡng cần thiết cho hoạt động sống của vi sinh vật?
3. Cơ chế và tác dụng của các yếu tố bên ngoài lên sinh trưởng của vi sinh vật?
4. Ý nghĩa của việc nghiên cứu đồ thị sinh trưởng, hiện tượng sinh trưởng kép?
5. Các kiểu hô hấp của VSV và cơ chế hoạt động?
6. Bản chất hóa học và sinh học của các quá trình lên men rượu, lactic, butyric và lên men methane?
7. Ứng dụng lên men lactic trong đời sống, sản xuất và trong công tác bảo vệ môi trường?

* Chọn đáp án đúng nhất:

8. Tất cả vi khuẩn quang tổng hợp:
 - a. Sử dụng diệp lục làm sắc tố quang tổng hợp.
 - b. Giải phóng O₂ phân tử trong quang hợp.
 - c. Hình thành các hạt lưu huỳnh trong tế bào.
 - d. Là những cơ thể quang tự dưỡng carbon.
9. Nghiên cứu các chất nhận điện tử phổ biến trong quá trình hô hấp được các VSV sử dụng, kết quả được tổng kết vào bảng sau:

<i>Kiểu hô hấp</i>	<i>Chất nhận e⁻</i>	<i>Sản phẩm khử</i>	<i>Ví dụ nhóm VSV</i>
Hiếu khí	O ₂	H ₂ O	(1)
Ky khí	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻	(2)
	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻ , N ₂ O, N ₂	(3)
	SO ₄ ²⁻	H ₂ S	(4)
	CO ₂	CH ₄	(5)
	S ⁰	H ₂ S	(6)
	Fe ³⁺	Fe ²⁺	(7)

Hãy điền vào các số (1)....(7) các nhóm VSV chủ yếu.

10. Nấm men *S. cerevisiae* thường sống trong môi trường có O₂, còn khi ky khí thì nấm men đơn bào này lên men rượu. Hãy viết sơ đồ các bước chính hoạt động của nấm men phân giải glucose.
 - a. Khi có O₂ phân tử;
 - b. Khi không có O₂ phân tử.
- * *Điền vào các chỗ trống:*
11. Trong kỹ thuật xác định số lượng tế bào bằng phương pháp nuôi cấy trên môi trường đặc, người ta gọi khuẩn lạc là.....(a).....(là chữ viết tắt của.....(b).....) vì rằng không phải bao giờ nó cũng được mọc lên từ một tế bào.....(c).....
12. Khi xác định sinh khối tế bào bằng phương pháp đo độ đục hay là phương pháp sử dụng....(a)...., nó dựa trên cơ sở....(b).... ánh sáng bởi canh trường nuôi cấy tế bào, trị số này....(c)....với số lượng tế bào có mặt trong dịch huyền phù.
13. Trong một hệ thống.....(a)....tiếng Anh gọi là.....(b).... người ta đưa vào một lượng chất dinh dưỡng xác định và trong suốt quá trình nuôi cấy không loại đi cái gì, còn trong hệ thống.....(c).... người ta đưa vào một thể tích môi trường mới tương đương với lượng bị.....(d).....

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. **Bioreactor:** Lò phản ứng sinh học (nồi lên men).
2. **Ultraviolet radiation:** Bức xạ tử ngoại.
3. **VSV nguyên dưỡng** (Prototrophes), là những VSV không nhất thiết cần các nhân tố sinh trưởng, những yếu tố của môi trường nuôi cấy thường là đầy đủ đối với chúng.
4. **VSV khuyết dưỡng** (Auxotrophes): là những VSV đòi hỏi các chất hữu cơ nhất định cần cho sự sinh trưởng của chúng.

Chương 5

VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG ĐẤT

Mục tiêu

- Nắm vững môi trường đất, các thành phần cấu thành đất và tác động của chúng đến vi sinh vật.
- Hiểu được cơ chế tác động của các yếu tố sinh học và lý hóa đối với vi sinh vật, các mối quan hệ giữa các nhóm vi sinh vật trong đất.
- Biết ứng dụng các biện pháp tiêu độc, khử trùng... bằng hóa chất và nhiệt độ.
- Hiểu được vai trò của vi sinh vật trong chuyển hóa các hợp chất hữu cơ, vô cơ trong môi trường đất.

5.1. MÔI TRƯỜNG ĐẤT

Đất là lớp vật chất nằm trên bề mặt của Trái Đất, có khả năng hỗ trợ sự sinh trưởng của thực vật và là môi trường sinh sống tự nhiên của vi sinh vật tới các loài động vật. Có năm yếu tố tác động vào quá trình hình thành đất: đá mẹ, khí hậu, sinh vật (thực vật, động vật và vi sinh vật), địa hình và thời gian. Quá trình hình thành đất xảy ra trong thời gian dài từ hàng chục đến hàng nghìn năm phụ thuộc vào các yếu tố trên. Đất có thể được chia thành hai tầng tổng quát: tầng bề mặt và tầng đất cát. Lớp đất cát không chịu tác động của quá trình phong hóa đất mẹ bởi khí hậu và có số lượng vi sinh vật ít hơn lớp đất bề mặt.

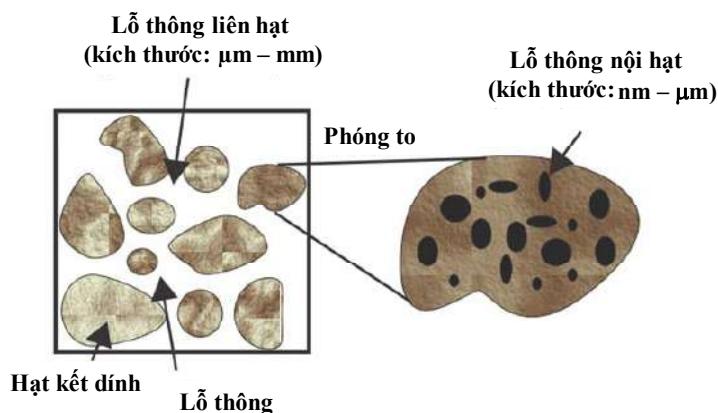
Môi trường tất cả các loại đất được cấu thành bởi ba thành phần: (1) thành phần rắn hay các hạt vô cơ thường kết hợp với các vật chất hữu cơ; (2) thành phần lỏng hay hòa tan và (3) thành phần không khí.

5.1.1. Thành phần rắn

5.1.1.1. Các hạt cặn bẩn và kết cấu đất

Thành phần rắn thường chiếm 45 – 50% về thể tích và thường chứa các thành phần khoáng. Silic (47%) và oxy (27%) là hai nguyên tố chiếm tỷ lệ cao trong thành phần khoáng. Hai nguyên tố này kết hợp với các nguyên tố khác tạo thành nhiều loại khoáng khác nhau, ví dụ: thạch anh – SiO_2 ; mica – $\text{K}_2\text{Al}_2\text{O}_5[\text{Si}_2\text{O}_5]_3\text{Al}(\text{OH})_4$. Kết quả của quá trình phong hóa đá mẹ tạo ra các hạt đất Soil particles. Dựa vào đường kính các hạt, hạt đất được chia thành đất cát, đất thịt và đất sét. Đường kính hạt đất cát từ 0,05 – 2,0 mm, chiếm khoảng 50% về khối lượng. Đường kính hạt đất thịt từ 0,002 – 0,05 mm, chiếm khoảng

20%. Đường kính hạt đất nhỏ hơn 0,0002 mm và chiếm khoảng 20%. Các thành phần keo trong đất bao gồm các chất hữu cơ (thường khoảng 3%) và vô cơ (thường khoảng 5%). Sự phân bố và gắn kết của các phần tử cát, thịt và sét được gọi là kết cấu đất. Giữa các thành phần khoáng của đất chứa các lỗ thông tạo độ xốp của đất. Lỗ thông này phụ thuộc vào kết cấu và cấu trúc của đất. Không khí, nước và các vi sinh vật lưu thông trong đất qua các lỗ thông. Lỗ thông giữa hai hạt khoáng kết dính được gọi là lỗ thông liên hạt và trong mỗi hạt khoáng gọi là lỗ thông nội hạt (hình 5.1), từ μm đến mm .



Hình 5.1. Lỗ thông giữa các hạt khoáng kết dính.

Lỗ thông này tăng lên nhờ hoạt động của rễ thực vật, giun và động vật nhỏ. Kết cấu và cấu trúc của đất rất quan trọng trong việc chi phối dòng nước di chuyển, các chất và quần thể vi sinh vật. Kích thước lỗ thông tùy vào kích thước của ba loại hạt khoáng cát, thịt hay sét. Kính thước lỗ thông được so sánh với kích thước các loài vi sinh vật (hình 5.2).

5.1.1.2. Khả năng trao đổi cation

Khả năng trao đổi cation xảy ra nhờ các chất tích điện âm kết hợp với các hạt sét. Các hạt sét luôn mang điện tích âm vì:

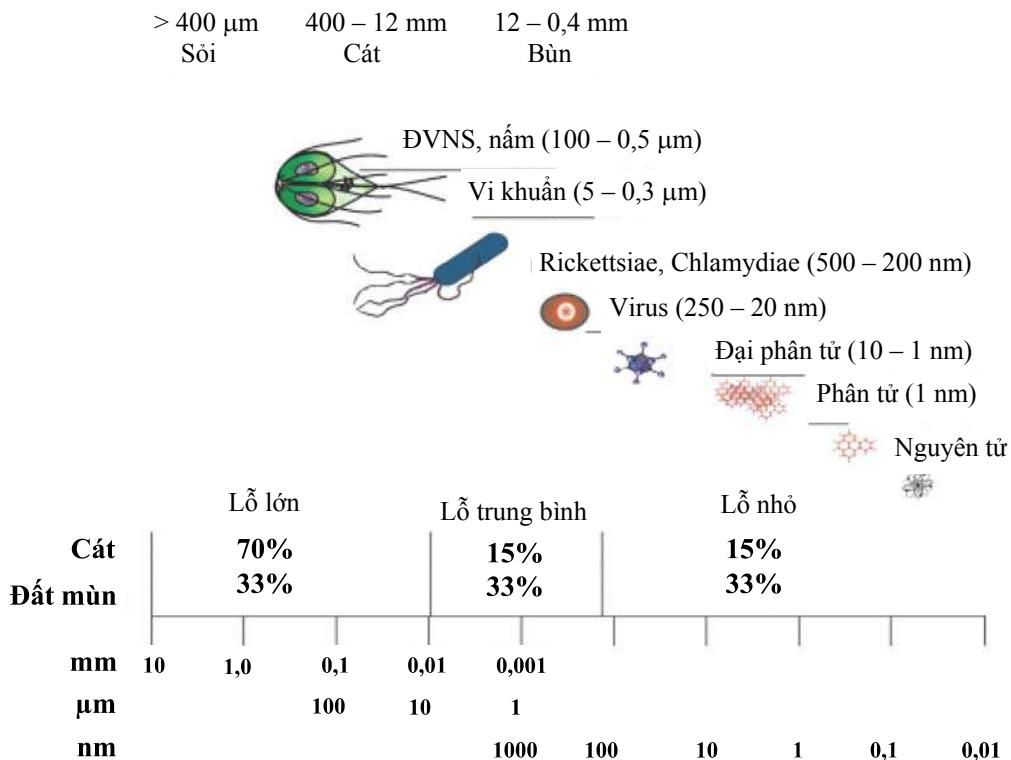
+ Sự thay thế đồng hình: các hạt sét tồn tại như lưới vô cơ được cấu tạo bởi silic và nhôm oxide. Việc thay thế Mg^{2+} thành Al^{3+} làm mất 1 điện tích dương và tích 1 điện tích âm. Việc thay thế liên tục sẽ làm tăng khả năng tích điện.

+ Sự ion hóa: các gốc ($-\text{OH}$) ở trên rìa mặt lưới có thể ion hóa trở thành gốc mang điện tích âm: $\text{Al}-\text{OH} = \text{Al}-\text{O}^- + \text{H}^+$. Khi pH tăng thì sự ion hóa cũng tăng lên, được gọi là tích điện phụ thuộc pH.

Trong đất thường tồn tại các cation như: Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ và H^+ . Trao đổi cation phụ thuộc vào nồng độ các cation trong dung dịch đất và ái lực của các cation ở điểm trao đổi.

Hút thẩm bè mặt ảnh hưởng đến sự di chuyển và khả năng sinh học của các hợp chất cũng như chất ô nhiễm trong đất. Hút thẩm bè mặt được định nghĩa bởi liên kết của các phân tử hữu cơ và vô cơ với thành phần rắn của đất.

Độ pH của đất ảnh hưởng đến khả năng hòa tan của các chất hóa học trong đất. Ở những vùng có lượng mưa cao, đất có độ pH < 5,5 mang tính acid. Ở những vùng đất khô cằn, hơi nước bốc hơi làm tăng nồng độ muối. Đất ở đây có độ pH > 8,5 mang tính kiềm. Đất trung tính có độ pH từ 6 – 8.

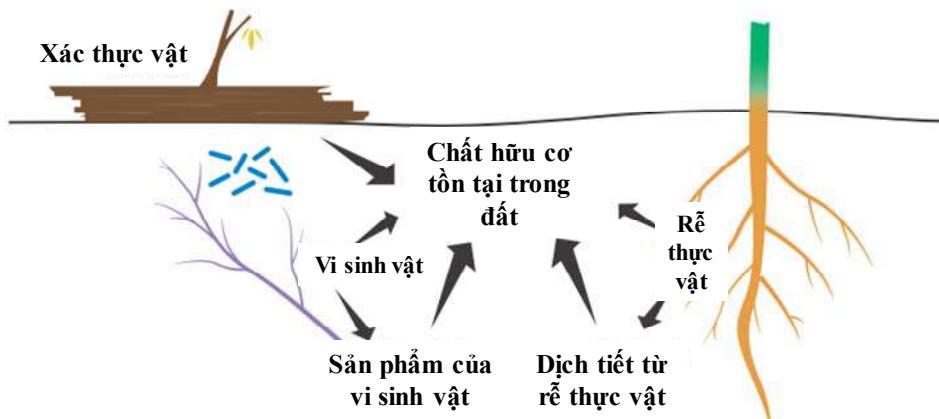


Hình 5.2. So sánh kích thước của các vi sinh vật với kích thước các lỗ giữa các hạt khoáng trong đất.

5.1.1.3. Vật chất hữu cơ

Vật chất hữu cơ trong đất bao gồm: (1) sinh khối sống của sinh vật gồm động vật, vi sinh vật và rễ thực vật; (2) vật chất sinh học chết và đang phân hủy; (3) chất mùn từ phân hủy sinh khối động, thực vật và vi sinh vật (hình 5.3). Vật chất hữu cơ trong đất có khí hậu khắc nghiệt cần cỗi chiếm dưới 1% và đất có khí hậu ẩm chiếm 5%. Ở tầng đất dưới bề mặt, vật chất hữu cơ chỉ chiếm dưới 0,1%, bởi vì tầng đất này không có xác thực vật và số lượng vi sinh vật rất ít.

Chất mùn từ các vật hữu cơ cung cấp nguồn dinh dưỡng ổn định cho vi sinh vật bản địa trong đất. Chất mùn có cấu trúc rất phức tạp, nó phản ánh độ đa dạng và phức tạp của các chất hữu cơ trong từng loại đất. Khối lượng phân tử biến động từ 700 đến 300.000 Da.



Hình 5.3. Các nguồn vật chất hữu cơ trong đất.

5.1.2. Thành phần lỏng

Dung dịch đất luôn thay đổi, bao gồm các chất hữu cơ và vô cơ hòa tan trong nước. Thành phần của dung dịch đất rất quan trọng cho các hoạt động sinh học vì vi sinh vật chứa gần 70% nước và yêu cầu nồng độ nước cao cho các hoạt động trao đổi chất. Thực tế, tất cả vi sinh vật đều được bao quanh bởi màng nước, chúng hấp thụ các chất dinh dưỡng cũng như bài tiết các chất thải của tế bào. Vì vậy, số lượng và thành phần các chất trong dung dịch đất ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cả vi sinh vật và thực vật. Thành phần của dung dịch đất phản ánh các chất hóa học có trong đất và dòng nước chảy vào cũng như chảy ra. Thành phần này bị ảnh hưởng bởi các hoạt động của con người như thủy lợi, phân bón, thuốc trừ sâu và các loại thuốc hóa học. Các chất hóa học không những ảnh hưởng đến thành phần dung dịch đất mà còn ảnh hưởng đến các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sống trong đất.

Nước là dung môi hòa tan các chất hóa học trong hệ thống xốp của đất. Việc di chuyển của nước trong đó kéo theo việc di chuyển của các hóa chất và vi sinh vật đất. Nước di chuyển trong thể xốp của đất phụ thuộc vào thể nước trong đất.

Thể nước trong đất (soil water potential) là số đơn vị công cần thiết để chuyển một lượng nước nhỏ từ độ cao và áp suất đặc trưng đến một điểm khác trong hệ thống xốp của đất.

Môi trường tối ưu cho sự sinh trưởng VSV hiếu khí trong các lỗ thông của đất là môi trường mà nước luôn có sẵn nhưng môi trường không bão hòa. Vi sinh vật hấp thụ các chất dinh dưỡng từ môi trường lỏng bao quanh chúng. Thông thường, hoạt động sinh trưởng của vi sinh vật trong đất lớn nhất tại áp suất 0,1 atm. Ở trạng thái nước bão hòa hoàn toàn, hàm lượng oxy hòa tan bị hạn chế làm ảnh hưởng đến hoạt động vi sinh vật.

5.1.3. Thành phần không khí

Không khí trong đất và khí quyển tiếp xúc trực tiếp với nhau nên môi trường không khí trong đất giống môi trường khí quyển như nitơ, oxy và khí carbon dioxide. Nhưng có sự khác nhau về tỷ lệ các khí giữa môi trường khí quyển, môi trường đất thoảng khí bề mặt và đất ngập nước (bảng 5.1).

Lượng O₂ trong đất có vai trò quan trọng trong phân hủy hiếu khí các vật chất hữu cơ. Khi thiếu O₂, các vật chất hữu cơ được phân hủy ky khí tạo thành CO₂ qua quá trình lên men hoặc hô hấp ky khí, nhưng quá trình này kém hiệu quả so với hô hấp hiếu khí. Vì vậy, O₂ là thành phần sống của hoạt động hiếu khí, O₂ là chất nhận điện tử cuối cùng trong quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ.

Bảng 5.1. Thành phần không khí trong môi trường đất

Vị trí	Thành phần không khí (% về thể tích)		
	N ₂	O ₂	CO ₂
Không khí	78,1	20,9	0,03
Đất bè mặt thoáng khí	78,1	18 – 20,5	0,3 – 3
Đất sét mìn hoặc đất bão hòa	> 79	~ 0 – 10	Có thể đến 10

Dộ ẩm của đất ảnh hưởng đến hàm lượng khí oxy hòa tan trong đất. Đất có lượng nước bão hòa, tất cả các lỗ thông bị ngập nước nên hàm lượng oxy rất thấp. Ở đất khô, các lỗ thông chứa đầy không khí nên độ ẩm rất thấp. Vì sinh vật hiếu khí yêu cầu lượng nước và oxy tối ưu cho hoạt động trao đổi chất.

Các hoạt động sống ở tầng đất dưới bì mặt rất thấp vì nguồn cung cấp chất hữu cơ rất thấp.

5.1.4. Thực trạng thoái hóa đất tự nhiên ở Việt Nam

5.1.4.1. Thoái hóa đất

Số liệu thống kê của Bộ Tài nguyên và Môi trường tổng hợp, năm 2015 tổng diện tích đất tự nhiên cả nước khoảng 33,1 triệu ha. Theo mục đích sử dụng, đất được phân thành ba nhóm chính: đất nông nghiệp, đất phi nông nghiệp và đất chưa sử dụng. Trong đó, diện tích nhóm đất nông nghiệp (nông, lâm, thủy sản) ước khoảng 26,8 triệu ha, chiếm khoảng 81% diện tích đất tự nhiên cả nước.

Tình hình thoái hóa đất ở nước ta có xu hướng tăng do các tác động tiêu cực của biến đổi khí hậu và hoạt động phát triển kinh tế – xã hội. Ô nhiễm đất gia tăng chủ yếu do hoạt động phát triển công nghiệp, sản xuất nông nghiệp, sinh hoạt, dịch vụ..., do chất thải, nước thải chưa được xử lý và phân bón hóa học, hóa chất bảo vệ thực vật (BVTV) chưa được quản lý, kiểm soát, xả thải vào môi trường đất.

Các dạng thoái hóa đất tự nhiên ở nước ta bao gồm: hoang mạc đá – hoang mạc đất khô cằn: gồm các núi đá và đất trống đồi núi trọc, thể hiện rõ nhất ở các vùng có lượng mưa thấp, đất phát triển trên các loại đá mẹ khó phong hóa, nghèo dinh dưỡng (khu vực miền Trung và Tây Nguyên). Hoang mạc cát (cát bay, cát chảy, cát trượt lở): gồm các dải cát hẹp trải dài dọc theo bờ biển, tập trung nhiều nhất ở dải ven biển miền Trung, Đồng bằng sông Cửu Long và một phần diện tích nhỏ dọc theo ven biển các tỉnh phía Bắc như Nam Định, Nghệ An, Thanh Hóa..., đất có độ phì nhiêu tự nhiên thấp, phần lớn là cấp

hạt cát nên khả năng giữ nước, giữ phân kém,... Hoang mạc đất nhiễm mặn: tập trung chủ yếu ở Đồng bằng sông Cửu Long, các tỉnh duyên hải miền Trung như Quảng Bình, Hà Tĩnh, Ninh Thuận..., đất thường có hàm lượng tổng số muối tan và độ dẫn điện (EC) cao. Hoang mạc đất nhiễm phèn: phân bố tại các khu vực Tứ giác Long Xuyên, Đồng Tháp Mười (đất phèn), bán đảo Cà Mau (đất phèn mặn). Ở miền Bắc, đất phèn chủ yếu tập trung ở vùng Kiên An – Hải Phòng, Thái Bình, Hải Dương và Quảng Ninh. Đất nhiễm phèn được đặc trưng bởi độ chua cao, nồng độ độc tố nhôm tiềm tàng cao và thiếu lân.

5.1.4.2. Ô nhiễm môi trường đất Việt Nam

Ô nhiễm môi trường đất Việt Nam có nhiều nguyên nhân, song nguyên nhân chính được xác định là do sử dụng không hợp lý phân bón hóa học và thuốc BVTV trong nông nghiệp, do các chất thải từ hoạt động công nghiệp, xây dựng và sinh hoạt, do các chất độc hóa học tồn lưu.

Bên cạnh phân bón hóa học, tình trạng lạm dụng thuốc BVTV phòng trừ sâu bệnh dịch hại đối với cây trồng diễn ra ở hầu hết các địa phương, việc không tuân thủ các quy trình kỹ thuật, không đảm bảo thời gian cách ly của từng loại thuốc, sử dụng các loại thuốc trôi nổi trên thị trường không được đăng ký, hàng giả, đóng gói không đúng khối lượng... đã dẫn đến hậu quả mất an toàn vệ sinh thực phẩm và làm ô nhiễm môi trường đất. Hóa chất BVTV tác động đến môi trường đất thông qua nhiều con đường khác nhau như nước thải từ kho chứa thuốc khi có sự cố xảy ra, nước mưa chảy tràn qua các kho chứa đã bị xuống cấp, lượng thuốc còn dư đọng lại trong chai bị quăng xuống ao, hồ, sông hay lượng thuốc dư thừa trong quá trình sử dụng quá liều lượng ngấm vào đất cũng như mạch nước ngầm... Dư lượng hóa chất BVTV ở một số vùng nông thôn đã có những dấu hiệu gia tăng. Ví dụ: tại Lâm Đồng kết quả nghiên cứu hơn 200 mẫu đất trồng rau bón phân vô cơ cho thấy hàm lượng lân và kali dễ tiêu cao hơn so với các mẫu đất khác. Đất trồng vừa giảm năng suất do nghèo kiệt chất hữu cơ và mất cân đối dinh dưỡng, vừa gây độc cho sản phẩm nông nghiệp. Bà con nông dân gọi hiện tượng đất chỉ được bón phân vô cơ là đất bị chai và bị chua hóa. (Nguồn: Viện Môi trường nông nghiệp, 2014)

Các điểm ô nhiễm chất độc hóa học tồn lưu được phân làm hai loại chính là các khu vực đất bị nhiễm dioxin do ảnh hưởng chiến tranh (khu vực bị phun rải chất độc hóa học và các sân bay quân sự) và các kho thuốc BVTV.

Tại Việt Nam, các khu vực bị nhiễm dioxin do bị phun rải chiếm khoảng 2,63 triệu ha, phân bố trên toàn miền Nam và các sân bay quân sự. Ước tính khoảng 15% tổng diện tích đất khu vực miền Nam còn chịu ảnh hưởng ở mức độ khác nhau từ các chất độc hại sử dụng trong chiến tranh, trong đó diện tích bị phun rải các chất có hoạt tính 2, 4, 5 – T chiếm 9,7% tổng diện tích. Ở một số sân bay trước kia tàng trữ, vận chuyển chất độc hóa học/dioxin thì hàm lượng dioxin trong đất có nơi lên đến 365.000 ppt TEQ (tiêu chuẩn đất cần xử lý của Việt Nam). Đặc biệt, tại ba điểm nóng về dioxin ở Việt Nam tại sân bay Biên Hòa, các khu vực ô nhiễm rộng và nằm rải rác tại các vị trí phía Bắc và phía Tây Nam của sân bay. Trong đó, đáng chú ý nhất là 5 khu vực có hàm lượng dioxin cao trên 1.000 ppt

TEQ với tổng diện tích đất ô nhiễm lên đến 163.000 m². Tại sân bay Đà Nẵng đã phát hiện ba khu vực có hàm lượng dioxin trong đất vượt quá 1.000 ppt TEQ. Các khu vực này nằm ở phía Bắc sân bay và có tổng diện tích lên đến 88.000 m². Đây là khu vực rất cần được xử lý ô nhiễm triệt để vì chúng nằm trong thành phố Đà Nẵng và gần với các khu dân cư. Tại sân bay Phù Cát, diện tích đất bị ô nhiễm khoảng 4.000 m² trong sân bay (*Nguồn: Văn phòng BCD 33, Bộ Tài nguyên và Môi trường, 2015*).

5.2. ĐẤT LÀ MÔI TRƯỜNG SỐNG CỦA VI SINH VẬT

5.2.1. Các yếu tố sinh học

Trong môi trường đất có rất nhiều nhóm sinh vật tồn tại, các vi sinh vật nhóm này phải cạnh tranh với các vi sinh vật nhóm khác. Chúng cạnh tranh về cơ chất, H₂O và các yếu tố để phát triển. Một số vi sinh vật tiết ra các chất ức chế hoặc độc tố như kháng sinh sẽ gây độc cho các vi sinh vật liền kề.Thêm vào đó, một số sinh vật ăn vi sinh vật như động vật nguyên sinh ăn vi khuẩn hoặc vi sinh vật ký sinh như virus gây nhiễm cả vi khuẩn và nấm. Khi một vi sinh vật không phải là bản địa được di nhập vào môi trường đất thường tồn tại trong thời gian ngắn, trừ khi đã được chọn lựa môi trường đặc thù. Ảnh hưởng này rất quan trọng trong sự tồn tại của vi sinh vật gây bệnh hay vi sinh vật phân hủy sinh học khi được ứng dụng để phân hủy sinh học hoặc kiểm soát sinh học (Biological control).

5.2.2. Mối quan hệ giữa các nhóm vi sinh vật trong đất

Sự phân bố của vi sinh vật trong đất vô cùng phong phú cả về số lượng cũng như thành phần loài. Trong quá trình sống chung như thế, chúng có một mối quan hệ tương hỗ vô cùng chặt chẽ. Dựa vào tính chất của các loại quan hệ giữa các nhóm vi sinh vật, người ta chia ra làm bốn loại quan hệ: ký sinh, cộng sinh, hỗ sinh và đối kháng.

5.2.2.1. Quan hệ ký sinh

Quan hệ ký sinh là hiện tượng vi sinh vật này sống ký sinh trên vi sinh vật khác, hoàn toàn ăn bám và gây hại cho vật chủ. Ví dụ như các loại virus sống ký sinh trong tế bào vi khuẩn hoặc một vài loài vi khuẩn sống ký sinh trên vi nấm. Các loại vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh thường hay bị một loại thực khuẩn thể ký sinh, trên môi trường dịch thể có hiện tượng môi trường đang đục trở nên trong. Nguyên nhân là do thực khuẩn thể xâm nhập và làm tan tất cả các tế bào vi khuẩn – gọi là hiện tượng sinh tan. Khi nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường đặc cũng có hiện tượng như vậy. Các thực khuẩn thể này tồn tại ở trong đất trồng cây họ đậu làm ảnh hưởng rất lớn đến quá trình hình thành nốt sần ở cây đậu.

5.2.2.2. Quan hệ cộng sinh

Là quan hệ hai bên cùng có lợi, bên này không thể thiếu bên kia trong quá trình sinh sống. Ở vi sinh vật, người ta ít quan sát thấy quan hệ cộng sinh. Có một số giả thiết cho rằng: ty thể – cơ quan hô hấp của tế bào vi nấm chính là một vi khuẩn cộng sinh với vi nấm.

Giả thiết đó dựa trên cấu tạo của ty thể có cả bộ máy DNA riêng biệt, có thể tự sao chép như một cơ thể độc lập. Giả thiết này chưa được công nhận hoàn toàn. Lại có giả thiết cho rằng, các plasmid có trong vi nấm và vi khuẩn chính là sự cộng sinh giữa virus và vi nấm hay vi khuẩn đó. Ví dụ như các plasmid mang gene kháng thuốc sẽ mang lại lợi cho vi khuẩn chủ là kháng được thuốc kháng sinh, vì thế mà hai bên cùng có lợi và gọi là quan hệ cộng sinh.

5.2.2.3. Quan hệ hô sinh

Là quan hệ hai bên cùng có lợi nhưng không nhất thiết phải có nhau mới sống được như quan hệ cộng sinh. Quan hệ này thường thấy trong sự sống của vi sinh vật vùng rẽ. Ví dụ như mối quan hệ giữa nấm mốc phân hủy tinh bột thành đường và những nhóm vi khuẩn phân giải loại đường đó. Mỗi quan hệ giữa nhóm vi khuẩn phân giải phosphor và nhóm vi khuẩn phân giải protein cũng là quan hệ hô sinh, trong đó nhóm thứ nhất cung cấp P cho nhóm thứ hai và nhóm thứ hai cung cấp N cho nhóm thứ nhất.

5.2.2.4. Quan hệ đối kháng

Quan hệ đối kháng lẫn nhau giữa hai nhóm vi sinh vật. Loại này thường tiêu diệt loại kia hoặc hạn chế quá trình sống của nhau. Ví dụ điển hình là xạ khuẩn sinh kháng sinh và nhóm vi khuẩn mẫn cảm với chất kháng sinh do xạ khuẩn sinh ra. Khi nuôi cấy hai nhóm này trên môi trường thạch đĩa, ta có thể thấy rõ hiện tượng đối kháng: xung quanh nơi xạ khuẩn mọc có một vòng vô khuẩn, tại đó vi khuẩn không mọc được. Người ta căn cứ vào đường kính của vòng vô khuẩn đó mà đánh giá khả năng tạo ra kháng sinh của xạ khuẩn. Tất cả các mối quan hệ trên đây của khu hệ vi sinh vật đất tạo nên những hệ sinh thái vô cùng phong phú trong từng loại đất. Chúng làm nên độ màu mỡ của đất, thay đổi tính chất lý hóa của đất và từ đó ảnh hưởng đến cây trồng.

5.2.3. Các yếu tố lý hóa học

*** Ánh sáng**

Ánh sáng thường xuyên qua vài cm đất bề mặt, vì vậy vi sinh vật quang dưỡng thường tồn tại ở lớp đất bề mặt. Các chỉ tiêu lý hóa như nhiệt độ và độ ẩm của đất bề mặt thường biến động theo thời gian trong ngày và theo mùa. Vì vậy, một số vi sinh vật bao gồm cả tảo thường chuyển đổi giữa quang dưỡng và hô hấp dị dưỡng các chất chuyển hóa khi thiếu ánh sáng. Địa y là dạng sống kết hợp giữa tảo lục hay vi khuẩn lam Nostoc và nấm để thích ứng với các môi trường khắc nghiệt. Nấm bảo vệ mắt nước, sinh vật quang dưỡng cung cấp năng lượng từ quá trình quang hợp.

*** Độ ẩm đất**

Nước cần thiết cho các hoạt động của vi sinh vật. Thường áp suất nước tối ưu cho các hoạt động là 0,1 atm giữa nước mao quản và nước tự do. Khả năng chịu mất nước cao nhất là nấm đến nấm mốc và cuối cùng là vi khuẩn.

* **Nhiệt độ đất**

Nhiệt độ biến thiên rất lớn đặc biệt là đất bề mặt. Các quần thể sinh vật đất chịu được sự biến thiên lớn của nhiệt độ bề mặt và thường chia ra các loại sau: ưa lạnh (nhiệt độ < 20 °C), ưa ấm (20 – 45 °C), ưa nhiệt (45 – 90 °C) và đặc biệt ưa nhiệt cực trị (> 90 °C). Phần lớn các vi sinh vật đều ưa ấm bởi vì ảnh hưởng của các dung môi trong đất lên nhiệt độ đất.

* **pH đất**

Đất tự nhiên thường có giá trị pH từ 6 – 8 và đây là pH tối ưu cho các vi sinh vật đất. Tuy nhiên, có một số loài thích pH thấp, như *Thiobacillus thiooxidans* có khả năng oxy hóa lưu huỳnh thành sulfite với pH tối ưu từ 2 – 3.

* **Kết cấu đất**

Kết cấu đất ảnh hưởng đến quần xã vi sinh vật trong đất. Đất pha cát, thịt và sét thường là môi trường lý tưởng cho các vi sinh vật vì chứa nhiều chất dinh dưỡng, nước và không khí. Đất cát và sét chứa số lượng vi sinh vật ít.

* **Dinh dưỡng đất**

Carbon và nitơ thường là nguồn dinh dưỡng định ra mức giới hạn quan trọng nhất cho các hoạt động của vi sinh vật. Nếu carbon và nitơ có hàm lượng thấp thì sinh trưởng và hoạt động của vi sinh vật đất cũng rất chậm. Một số vi sinh vật đất chuyển sang trạng thái ngủ khi nguồn dinh dưỡng cạn kiệt. Tuy nhiên, các sinh vật cố định đạm thường có số lượng lớn và hoạt động mạnh nhờ rễ cây tiết ra chất dinh dưỡng.

* **Thể năng oxy hóa – khử của đất**

Thể năng oxy hóa khử (E_h) là đại lượng đo mức độ oxy hóa hay khử cơ chất trong môi trường tính bằng volt hoặc millivolt (V hoặc mV). Vi sinh vật hiếu khí thường thích môi trường oxy hóa nên có thể khử +800 mV. Vi sinh vật kỵ khí thích môi trường khử có thể khử -300 mV. Oxy trong đất có thể khử +800 mV.

5.3. VI SINH VẬT TRONG ĐẤT

Đất bề mặt có nhiều quần thể vi sinh vật như vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn cổ, nấm, tảo, động vật nguyên sinh, phage và virus.Thêm vào đó còn có các vi sinh vật di nhập vào đất bởi con người và các hoạt động của động vật. Con người đưa các vi khuẩn vào đất với mục đích phân hủy sinh học hoặc kiểm soát sinh học. Vi sinh vật còn du nhập vào đất nhờ ứng dụng các loại phân từ chất thải động vật hoặc phân chim hay chất thải từ động vật khác. Các vi sinh vật này làm phong phú thêm các quần thể vi sinh vật trong đất.

Tóm lại, đất chứa nhiều vi sinh vật gọi là *đất sống* (*living soil*). Đất càng màu mỡ càng chứa nhiều vi sinh vật.

5.3.1. Vi khuẩn (Bacteria)

Trong đất vi khuẩn thường có số lượng nhiều nhất. Số lượng vi khuẩn tùy thuộc vào từng loại môi trường, đặc biệt nhiều trong đất ẩm giàu chất mùn ở nhiệt đới. Số lượng vi khuẩn có thể nhìn thấy được (khuẩn lạc) dưới điều kiện nuôi cấy từ 10^7 đến 10^8 CFU/g đất trong tổng số 10^{10} tế bào/g đất (bảng 5.2). Trong đất chưa bão hòa, vi khuẩn hiếu khí có số lượng gấp hai đến ba lần vi khuẩn ký khí. Số lượng vi khuẩn ký khí tăng theo chiều sâu của đất. Hệ VSV đất đóng vai trò rất lớn trong quá trình hình thành đất, làm tăng độ phì nhiêu cho đất (các vi khuẩn cố định nitơ, vi khuẩn phân giải cellulose) và có vai trò quan trọng trong tuần hoàn vật chất trong tự nhiên (bảng 5.3).

Bảng 5.2. Vi khuẩn chiếm ưu thế trong đất

<i>Loài</i>	<i>Đặc tính</i>	<i>Chức năng</i>
<i>Arthrobacter</i>	Hiếu khí, dị dưỡng, Gram dương hoặc âm, chiếm đến 40% số lượng vi khuẩn đất được nuôi cấy.	Tuần hoàn vật chất và phân hủy sinh học.
<i>Streptomyces</i>	Xạ khuẩn hiếu khí, dị dưỡng, Gram dương, chiếm đến 5 – 20% số lượng vi khuẩn đất được nuôi cấy.	Tuần hoàn vật chất và phân hủy sinh học. Sinh kháng sinh, ví dụ: <i>Streptomyces scabies</i> ...
<i>Pseudomonas</i>	Dị dưỡng, Gram âm, hiếu khí hoặc ký khí không bắt buộc. Sử dụng hệ thống nhiều loại enzyme khác nhau, chiếm 10 – 20% số lượng vi khuẩn đất được nuôi cấy.	Tuần hoàn vật chất và phân hủy sinh học, đặc biệt vật chất hữu cơ. Tác nhân khống chế sinh học.
<i>Bacillus</i>	Dị dưỡng hiếu khí, Gram dương, tạo nội bào tử, chiếm 2 – 10% số lượng vi khuẩn đất được nuôi cấy.	Tuần hoàn vật chất và phân hủy sinh học. Tác nhân khống chế sinh học, như: <i>Bacillus thuringiensis</i> .

Trước đây vi khuẩn được phân loại dựa vào kỹ thuật nuôi cấy. Ngày nay vi khuẩn được phân loại dựa theo phương pháp phân tử. Phương pháp này dựa trên sự so sánh các thông tin di truyền chứa đựng trong DNA của các nhóm VSV khác nhau. Vì các thông tin di truyền được mã hóa bởi DNA, mà các cặp base (của purin với pyrimidin) tạo thành các gene và để làm khuôn mẫu tổng hợp nên các polypeptid. Kiểu phân loại này bao gồm nhiều loại kỹ thuật:

- Dựa theo tỷ lệ các base của các DNA (hoặc theo sự cấu thành của các DNA).
- Lai DNA (DNA hybridisation).
- Lai sinh học (biological hybridisation).

– Phân loại dựa trên cấu trúc phân tử protein kết hợp với phương pháp thống kê. Theo phương pháp này, vi khuẩn rất đa dạng với hơn 10.000 loài trong 1 g đất. Không phải tất cả các loài vi khuẩn này đều có thể nuôi cấy được ở phòng thí nghiệm.

Bảng 5.3. Vi khuẩn đất tự dưỡng quan trọng

Loài	Đặc tính	Chức năng
<i>Nitrosomonas</i>	Gram âm, hiếu khí	Chuyển hóa NH_4^+ thành NO_2^- (bước đầu tiên cố định đạm)
<i>Nitrobacter</i>	Gram âm, hiếu khí	Chuyển hóa NO_2^- thành NO_3^- (bước thứ hai cố định đạm)
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Gram âm, hiếu khí	Oxy hóa S thành SO_4^{2-}
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Gram âm, kỵ khí không bắt buộc	Oxy hóa S thành SO_4^{2-}
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Gram âm, hiếu khí	Oxy hóa Fe^{2+} thành Fe^{3+}

Bảng 5.4. Vi khuẩn đất dị dưỡng quan trọng

Loài	Đặc tính	Chức năng
<i>Actinomycetes, e.g., Streptomyces</i>	Hiếu khí, Gram dương, dạng sợi	Tạo mùi trong đất và kháng sinh
<i>Bacillus</i>	Hiếu khí, Gram dương, tạo bào tử	Tuần hoàn carbon, sản xuất thuốc trừ sâu và kháng sinh
<i>Clostridium</i>	Kỵ khí, Gram dương, tạo bào tử	Tuần hoàn carbon, sản sinh độc tố E, F tùy loài. <i>C. thermocellum</i> lên men Ethanol
<i>Methanotrophs, e.g., Methylosinus</i>	Hiếu khí	Oxy hóa methane và đồng trao đổi chất trichloroethylene (TCE) sử dụng enzyme methanemonooxygenase.
<i>Cupriavidus necator</i>	Hiếu khí, Gram âm	Phân hủy 2,4-D nhờ plasmid pJP4
<i>Rhizobium</i>	Hiếu khí, Gram âm	Cố định đạm, cộng sinh ở cây họ đậu
<i>Frankia (xã khuẩn)</i>	Hiếu khí, hoặc vi hiếu khí, Gram dương	Cố định đạm, cộng sinh trong nốt rễ ở cây phi lao (<i>Casuarina equisetifolia</i>)
<i>Agrobacterium</i>	Hiếu khí, Gram âm	Tác nhân gây bệnh khói u ở thực vật

5.3.2. Xạ khuẩn (Actinomycetes)

Xạ khuẩn là vi khuẩn với đặc tính khác biệt nên được xếp vào nhóm riêng. Xạ khuẩn trong đất có vai trò quan trọng trong quần xã vi khuẩn. Chúng có thể tồn tại ở điều kiện pH và nhiệt độ cao hay áp lực nước. Về mặt hình thái, xạ khuẩn giống vi nấm vì tế bào kéo dài và phân nhánh dạng sợi gọi là khuẩn ty thể, hiếu khí và Gram dương. Hệ sợi của xạ khuẩn nhỏ hơn nhiều so với sợi nấm. Số lượng xạ khuẩn trong nước biển khoảng 5 – 40 CFU/ml. Xạ khuẩn có khả năng sử dụng các cơ chất trong đất, đặc biệt là các đại phân tử từ côn trùng và thực vật bị phân hủy không hoàn toàn như chitin, cellulose và hemicellulose (bảng 5.5).

Bảng 5.5. Đặc tính và chức năng của xạ khuẩn

Đặc tính		Chức năng
Cấu trúc	Sinh vật nhân sơ (prokaryote)	
Kích thước	Đường kính 1 – 2 µm	
Hình thái	Các sợi dài của cầu khuẩn	
Nhuộm Gram	Gram dương	
Hô hấp	Phần lớn hiếu khí, cũng có thể ký khí	
Sinh cảnh	Đất hoặc nước biển	
Số lượng (Biển)	5 – 40 CFU/ml	
Đất	10^6 – 10^8 /g	<ul style="list-style-type: none">– Nguồn tạo các sản phẩm tự nhiên như kháng sinh: streptomycin...– Tạo các hợp chất có mùi trong đất hoặc nước.– Khả năng phân hủy các phân tử hữu cơ phức tạp.– Xạ khuẩn <i>Frankia</i> có khả năng cố định đạm cộng sinh trong nốt rễ cây phi lao.

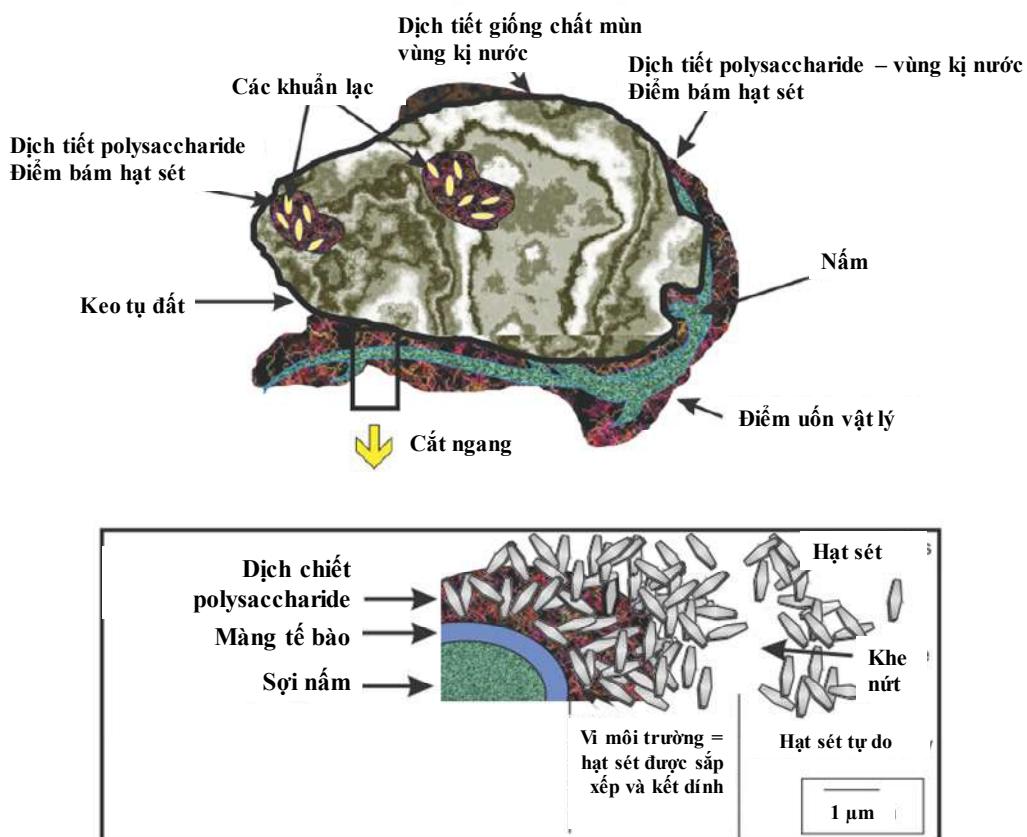
5.3.3. Vi khuẩn cổ

Vi khuẩn cổ phân bố rộng với số lượng lớn trong tự nhiên, có thể tìm thấy trong đất ở suối nước nóng hay vùng đất môi trường “cực trị” rất mặn, ký khí tuyệt đối hay acid rất thấp, nhiệt độ rất cao... Vi khuẩn cổ có vai trò trong tuần hoàn C, N và S, ví dụ như cố định đạm và tạo khí methane. Có nhiều quần thể vi khuẩn cổ có khả năng oxy hóa ammonia. Ở lớp đất dưới bề mặt, oxy hóa ammonia có vai trò rất quan trọng vì lớp đất này có mức độ dinh dưỡng và pH thấp.

5.3.4. Vi nấm (Microfungi)

Vi nấm là những vi sinh vật hệ sợi không có diệp lục hiếu khí phân bố chủ yếu trên bề mặt đất với số lượng từ 10^5 đến 10^6 CFU trong 1 g đất. Mặc dù số lượng vi nấm ít nhưng sinh khối của nó lớn hơn vi khuẩn trong đất, bởi vì kích thước của vi nấm lớn, sợi vi nấm có đường kính từ 2 đến 10 µm. Vì kích thước lớn nên vi nấm hạn chế phân bố trong các lỗ thông két cầu đất. Riêng nấm men có dạng đơn bào, có khoảng 10^3 CFU trong 1 g đất.

Vi nấm đóng vai trò trong các vòng tuần hoàn các chất trong đất, đặc biệt là phân giải các vật chất hữu cơ đơn giản (đường) và phức tạp (cellulose và lignin). Vai trò phân giải của vi nấm càng quan trọng hơn trong môi trường pH thấp vì có khả năng chịu được pH thấp hơn vi khuẩn. Một số chi vi nấm trong đất liên quan đến vòng tuần hoàn vật chất như *Penicillium* và *Aspergillus*. Vi nấm cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành cấu trúc đất vì sợi của vi nấm bám vào các hạt đất (hình 5.4). Nhờ khả năng phân hủy các hợp chất của nấm nên nấm được sử dụng để phân hủy các chất gây ô nhiễm như: *Phanerochaete chrysosporium*. Một số loài vi nấm gây bệnh cho thực vật như *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. Một số khác gây bệnh cho người và động vật. Ví dụ như loài vi nấm *Coccidioides immitis* gây bệnh phổi mãn tính ở người. Vi nấm Mycorrhiza kết hợp với rễ cây tạo thuận lợi cho rễ thực vật hấp thụ chất dinh dưỡng khoáng.



Hình 5.4. Sự hình thành keo tụ nhờ vi sinh vật đất.

5.3.5. Tảo (Algae)

Tảo thường có hình thức quang dưỡng nên để tồn tại và trao đổi chất, chúng cần nguồn năng lượng mặt trời và CO₂. Vì vậy tảo thường phân bố ở nơi có ánh sáng trên bề mặt đất. Tuy nhiên, một số loài tảo có thể tìm thấy ở độ sâu 1 m nhờ khả năng sinh trưởng dị dưỡng cũng như quang dưỡng, ví dụ: tảo lục và tảo cát. Thường thì tảo phát triển mạnh

trong 10 cm lớp đất bề mặt và có số lượng từ 5.000 đến 10.000 tế bào trong 1 g đất, nhưng khi có hiện tượng tảo nở hoa số lượng lên đến hàng triệu tế bào trong 1 g đất.

Trao đổi chất của tảo quan trọng trong quá trình hình thành đất nhờ: (1) Tảo cung cấp nguồn dinh dưỡng carbon qua quá trình quang合作 và thải carbonic acid giúp quá trình phong hóa các hạt khoáng trong đất liên kết; (2) Tảo tạo ra một lượng lớn polysaccharide ngoại bào giúp kết dính các hạt đất.

Số lượng tảo phát triển theo mùa, mạnh nhất vào mùa xuân và mùa thu, bởi vì khô nước vào mùa hè thúc đẩy phát triển của tảo.

Bốn nhóm tảo chính được tìm thấy trong đất:

– Tảo lục hay Chlorophyta: thường thấy trong đất acid, ví dụ: *Chlamydomonas*.

– Tảo cát: thường thấy ở đất trung tính hoặc kiềm, ví dụ: *Navicula*.

– Tảo lục – vàng: ví dụ *Botrydiopsis*.

– Khuẩn tảo lục: chúng được phân loại thuộc vi khuẩn nhưng có nhiều đặc điểm giống tảo. Chúng có khả năng cố định đạm.

Ở vùng đất ôn đới, số lượng tảo lần lượt như sau: tảo lục, tảo cát, vi khuẩn lam, tảo lục và tảo lục – vàng. Ở vùng đất nhiệt đới, vi khuẩn lam và khuẩn tảo lục chiếm đa số.

5.3.6. Động vật nguyên sinh (Protozoa)

Động vật nguyên sinh là sinh vật nhân thực có cấu tạo đơn bào, chiều dài có thể đến 5,5 mm. Phần lớn động vật nguyên sinh là dị dưỡng, tồn tại bằng cách tiêu thụ vi khuẩn, nấm, tảo hoặc phân giải các hợp chất hữu cơ trong đất. Chúng có kích thước lớn nên tiêu thụ số lượng lớn các sinh vật nhỏ hơn làm nguồn thức ăn.

Động vật nguyên sinh phân bố trong lớp đất bề mặt dày 15 đến 20 cm, thường tập trung gần bề mặt rễ cây nơi có nhiều nguồn thức ăn. Hình dạng có thể thay đổi linh hoạt để di chuyển qua các màng nước bao quanh các hạt đất cũng như qua các lỗ thông trong đất.

Có ba loại động vật nguyên sinh chính: có roi, amip và có lông rung.

– Động vật nguyên sinh có roi: có chúa diệp lục, ví dụ: *Euglena* hoặc không có diệp lục, ví dụ: *Oicomonas*.

– Động vật nguyên sinh amip hay còn gọi là trùng chân giã, có số lượng lớn nhất so với các loại động vật nguyên sinh khác.

– Động vật nguyên sinh có lông: di chuyển bằng cách cử động các lông bao phủ quanh cơ thể. Số lượng quần thể động vật nguyên sinh có lông thay đổi theo số lượng vi khuẩn trong đất – nguồn thức ăn chính của chúng.

Số lượng động vật nguyên sinh trong đất ở đất phi nông nghiệp ôn đới vào khoảng 30.000 trong 1 g đất. Ở đất trồng ngô vùng nhiệt đới, có khoảng $1,6 \times 10^6$ trong 1 g đất.

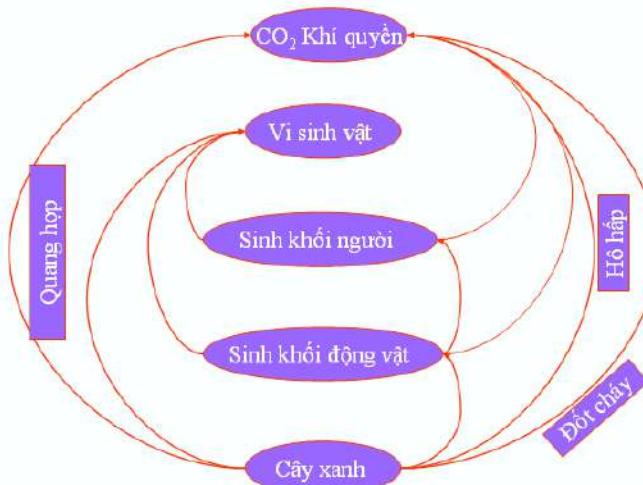
5.4. SỰ CHUYỂN HÓA CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ, VÔ CƠ TRONG ĐẤT

5.4.1. Sự chuyển hóa các hợp chất carbon của vi sinh vật

5.4.1.1. Vòng tuần hoàn carbon

Carbon là thành phần thiết yếu cho mọi sự sống đã biết, không có nó thì sự sống mà chúng ta đã biết không thể tồn tại. Carbon được con người sử dụng chủ yếu là các carbohydrate và nhiên liệu hóa thạch như than, khí methane và dầu mỏ (xăng dầu).

Sự luân chuyển của nguyên tố carbon giữa cơ thể và môi trường nhờ hoạt động sống của các sinh vật trong hệ sinh thái. Carbon dioxide (CO_2) trong khí quyển hay trong nước được sinh vật tự dưỡng hấp thụ và biến đổi thành các hợp chất hữu cơ phức tạp như carbohydrate, protein, lipid... thông qua quá trình quang hợp và những phản ứng sinh hóa. Một phần các chất được tạo thành cấu trúc nên cơ thể thực vật. Thực vật được động vật hay các sinh vật dị dưỡng sử dụng, sau đó, các chất bài tiết cũng như xác chết của sinh vật bị vi khuẩn, vi nấm phân hủy đến giai đoạn cuối cùng (giai đoạn khoáng hóa) trả lại carbon dioxide cho môi trường.



Hình 5.5. Chu trình carbon trong môi trường tự nhiên.

(Carbon trong tự nhiên luôn luân chuyển và được cân bằng nhờ: Quá trình quang hợp của cây xanh, một số VSV; Quá trình hô hấp của người – động vật, sự đốt cháy; Quá trình phân hủy carbon, quá trình lên men của các vi sinh vật.

5.4.1.2. Vai trò của vi sinh vật trong vòng tuần hoàn carbon

Carbon trong tự nhiên nằm ở rất nhiều dạng hợp chất khác nhau, từ các hợp chất vô cơ đến các hợp chất hữu cơ. Các dạng này không bất biến mà luôn luôn chuyển hóa từ dạng này sang dạng khác, khép kín thành một chu trình chuyển hóa hoặc vòng tuần hoàn carbon trong tự nhiên. VSV đóng một vai trò quan trọng trong một số khâu chuyển hóa của vòng tuần hoàn này.

Các hợp chất carbon hữu cơ chứa trong động vật, thực vật, VSV, khi các VSV này chết đi sẽ để lại một lượng chất hữu cơ không lòi trong đất. Nhờ hoạt động của các nhóm VSV dị dưỡng carbon sống trong đất, các chất hữu cơ này dần dần bị phân hủy tạo thành CO₂. CO₂ được thực vật và VSV sử dụng trong quá trình quang hợp lại biến thành các hợp chất carbon hữu cơ của cơ thể thực vật. Động vật và con người sử dụng carbon hữu cơ của thực vật biến thành carbon hữu cơ của động vật và người. Người, động vật, thực vật đều thải ra CO₂ trong quá trình sống, đồng thời khi chết đi để lại trong đất một lượng lớn chất hữu cơ, VSV lại bị phân hủy. Cứ thế trong tự nhiên các dạng hợp chất carbon được chuyển hóa liên tục. Dưới đây ta xét đến các quá trình chuyển hóa chính mà VSV tham gia.

5.4.1.3. Sự phân giải một số hợp chất carbon do vi sinh vật

a) Sự phân giải cellulose

– Cellulose trong tự nhiên:

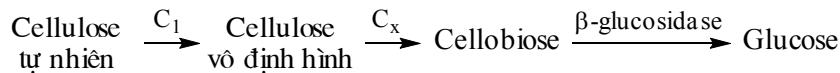
Cellulose là thành phần chủ yếu của màng tế bào thực vật. Ở cây bông, cellulose chiếm tới 90% trọng lượng khô, ở các loại cây gỗ nói chung cellulose chiếm 40 – 50%. Hàng ngày, hàng giờ, một lượng lớn cellulose được tích luỹ lại trong đất do các sản phẩm tổng hợp của thực vật thải ra, cây cối chết đi, cành lá rụng xuống. Một phần không nhỏ do con người thải ra dưới dạng rác rưởi, giấy vụn, phoi bào, mùn cưa... Nếu không có quá trình phân giải của VSV thì lượng chất hữu cơ không lòi này sẽ tràn ngập Trái Đất.

Cellulose có cấu tạo dạng sợi, có cấu trúc phân tử là 1 polymer mạch thẳng, mỗi đơn vị là một disaccharide gọi là cellobiose. Cellobiose có cấu trúc từ 2 phân tử D-glucose. Cấu trúc bậc 2 và bậc 3 rất phức tạp thành cấu trúc dạng lớp gắn với nhau bằng lực liên kết hydro. Lực liên kết hydro trùng hợp nhiều lần nên rất bền vững, bởi vậy cellulose là hợp chất khó phân giải. Dịch tiêu hóa của người và động vật không thể tiêu hóa được chúng. Động vật nhai lại tiêu hóa được cellulose nhờ khu hệ VSV sống trong dạ cỏ.

– Cơ chế của quá trình phân giải cellulose nhờ vi sinh vật:

Cellulose là một cơ chất không hòa tan, khó phân giải. Bởi vậy, VSV phân hủy cellulose phải có một hệ enzyme gọi là hệ enzyme cellulase bao gồm bốn enzyme khác nhau. Enzyme C₁ có tác dụng cắt đứt liên kết hydro, biến dạng cellulose tự nhiên có cấu hình không gian thành dạng cellulose vô định hình, enzyme này gọi là cellobiohydrolase.

Enzyme thứ hai là Endoglucanase có khả năng cắt đứt các liên kết β-1,4 bên trong phân tử tạo thành những chuỗi dài. Enzyme thứ ba là Exo – gluconase tiến hành phân giải các chuỗi trên thành disaccharide gọi là cellobiose. Cả hai loại enzyme Endo và Exo – gluconase được gọi là Cx. Enzyme thứ 4 là β-glucosidase tiến hành thủy phân cellobiose thành glucose.



– Vi sinh vật phân hủy cellulose:

Trong thiên nhiên có nhiều nhóm VSV có khả năng phân hủy cellulose nhờ có hệ

enzyme cellulase ngoại bào. Trong đó vi nấm là nhóm có khả năng phân giải mạnh vì nó tiết ra môi trường một lượng lớn enzyme đầy đủ các thành phần. Các vi nấm có hoạt tính phân giải cellulose đáng chú ý là *Trichoderma*. Hầu hết các loài thuộc chi *Trichoderma* sống hoại sinh trong đất và đều có khả năng phân hủy cellulose. Chúng tiến hành phân hủy các tàn dư của thực vật để lại trong đất, góp phần chuyển hóa một lượng chất hữu cơ không lò. *Trichoderma* còn sống trên tre, nứa, gỗ tạo thành lớp mốc màu xanh phá huỷ các vật liệu trên. Trong nhóm vi nấm ngoài *Trichoderma* còn có nhiều giống khác có khả năng phân giải cellulose như *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*...

Nhiều loài vi khuẩn cũng có khả năng phân hủy cellulose, tuy nhiên cường độ không mạnh bằng vi nấm. Nguyên nhân là do số lượng enzyme tiết ra môi trường của vi khuẩn thường nhỏ hơn, thành phần các loại enzyme không đầy đủ. Thường ở trong đất có ít loài vi khuẩn có khả năng tiết ra đầy đủ bốn loại enzyme, trong hệ enzyme cellulase. Nhóm này tiết ra một loại enzyme trong hệ enzyme cellulase. Nhóm khác lại tiết ra một loại enzyme khác, chúng phối hợp với nhau để phân giải cơ chất trong môi quan hệ hô sinh.

Nhóm vi khuẩn hiếu khí bao gồm *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Achromobacter*.

Nhóm vi khuẩn kỵ khí bao gồm *Clostridium* và đặc biệt là nhóm vi khuẩn sống trong dạ cỏ của động vật nhai lại. Chính nhờ nhóm vi khuẩn này mà trâu, bò có thể sử dụng được cellulose có trong cỏ, rơm rạ làm thức ăn. Đó là những cầu khuẩn thuộc chi *Ruminococcus* có khả năng phân hủy cellulose thành đường và các acid hữu cơ.

Ngoài vi nấm và vi khuẩn, xạ khuẩn và niêm vi khuẩn cũng có khả năng phân hủy cellulose. Người ta thường sử dụng xạ khuẩn đặc biệt là chi *Streptomyces* trong việc phân hủy rác thải sinh hoạt. Những xạ khuẩn này thường thuộc nhóm ưa nhiệt, sinh trưởng, phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 45 – 50 °C, rất thích hợp với quá trình ủ rác thải.

b) Sự phân giải tinh bột

– Tinh bột trong tự nhiên:

Tinh bột là chất dự trữ chủ yếu của thực vật, bởi vậy nó chiếm một tỷ lệ lớn trong thực vật, đặc biệt là trong những cây có củ. Trong tế bào thực vật, nó tồn tại ở dạng các hạt tinh bột. Khi thực vật chết đi, tàn dư thực tích luỹ ở trong đất một lượng lớn tinh bột. Nhóm VSV phân hủy tinh bột sống trong đất sẽ tiến hành phân hủy chất hữu cơ này thành những hợp chất đơn giản, chủ yếu là đường và acid hữu cơ.

Tinh bột gồm hai thành phần amylose và amylopectin. Amylose là những chuỗi không phân nhánh bao gồm hàng trăm đơn vị glucose liên kết với nhau bằng dây nối 1,4-glycoside. Amylopectin là các chuỗi phân nhánh; các đơn vị glucose liên kết với nhau bằng liên kết 1,4- và 1,6-glycoside (liên kết 1,6-glycoside ở những chỗ phân nhánh). Amylopectin chính là dạng liên kết của các amylose thường chiếm 10 – 30%, amylopectin chiếm 30 – 70%. Đặc biệt có một số dạng tinh bột ở một vài loại cây chỉ chứa một trong hai thành phần amylose hoặc amylopectin.

– Cơ chế của quá trình phân giải tinh bột nhờ vi sinh vật:

Ví sinh vật phân giải tinh bột có khả năng tiết ra môi trường hệ enzyme amylase bao gồm bốn enzyme:

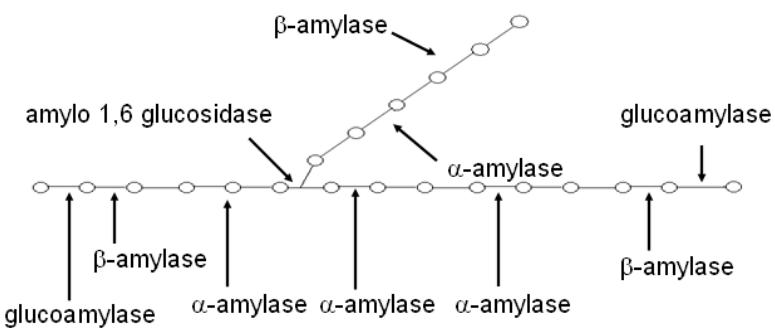
+ α -Amylase có khả năng tác động vào bất kỳ mối liên kết 1,4-glycoside nào trong phân tử tinh bột. Bởi thế α -amylase còn được gọi là endoamylase. Dưới tác động của α -amylase phân tử tinh bột được cắt thành nhiều đoạn ngắn gọi là sự dịch hóa tinh bột. Sản phẩm của sự dịch hóa thường là các đường 3 carbon gọi là maltotriose.

+ β -Amylase chỉ có khả năng cắt đứt mối liên kết 1,4-glycoside ở cuối phân tử tinh bột bởi thế còn gọi là exoamylase. Sản phẩm của β -amylase thường là đường disaccharide maltose.

+ Amylo-1,6-glycosidase có khả năng cắt đứt mối liên kết 1,6-glycoside tại những chỗ phân nhánh của amylopectin.

+ Glucoamylase phân giải tinh bột thành glucose và các oligosaccharide. Enzyme này có khả năng phân cắt cả hai loại liên kết 1,4- và 1,6-glycoside.

Dưới tác động của bốn loại enzyme trên, phân tử tinh bột được phân giải thành đường glucose.



Hình 5.6. Sơ đồ minh họa quá trình phân giải tinh bột bằng enzyme.

– VSV phân giải tinh bột:

Trong đất có nhiều loại VSV có khả năng phân giải tinh bột. Một số VSV có khả năng tiết ra môi trường đầy đủ các loại enzyme trong hệ enzyme amylase. Ví dụ như một số vi nấm bao gồm một số loài trong các chi *Aspergillus*, *Fusarius*, *Rhizopus*... Trong nhóm vi khuẩn có một số loài thuộc chi *Bacillus*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*... Xạ khuẩn cũng có một số chi có khả năng phân hủy tinh bột.

Đa số các VSV không có khả năng tiết đầy đủ hệ enzyme amylase phân hủy tinh bột. Chúng chỉ có thể tiết ra môi trường một hoặc một vài enzyme trong hệ đó. Ví dụ như các loài *Aspergillus*, *Candida*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus*, *Clostridium pasteurianum*, *Clos. butyricum*... chỉ có khả năng tiết ra môi trường một loại enzyme α -amylase. Các loài *Aspergillus oryzae*, *Clostridium acetobutilicum*... chỉ tiết ra môi trường β -amylase. Một số loài khác chỉ có khả năng tiết ra môi trường enzyme gluco-amylase. Các nhóm này cộng tác với nhau trong quá trình phân hủy tinh bột thành đường.

Trong sản xuất, người ta thường sử dụng các nhóm VSV có khả năng phân hủy tinh bột. Ví dụ như các loại nấm mốc thường được dùng ở giai đoạn đầu của quá trình làm rượu, tức là giai đoạn thủy phân tinh bột thành đường. Trong chế biến rác thải hữu cơ, người ta cũng sử dụng những chủng VSV có khả năng phân hủy tinh bột để phân hủy tinh bột có trong thành phần rác hữu cơ.

5.4.1.4. Sự cố định CO_2

Vi sinh vật có thể cố định CO_2 hoặc chuyển phân tử vô cơ này thành carbon hữu cơ và đồng hóa nó theo ba con đường chủ yếu. Hầu như tất cả các VSV tự dưỡng đều cố định CO_2 qua con đường trao đổi chất đặc biệt được gọi là chu trình Calvin – Benson hoặc chu trình pentosephosphate khử. Mặc dù hoạt động trong các cơ thể quang hợp có nhân thật và hầu hết cơ thể quang hợp có nhân nguyên thủy nhưng chu trình Calvin lại vắng mặt ở *Archaea* (vi khuẩn cổ), một số vi khuẩn ký khí bắt buộc và một số vi khuẩn hiếu khí. Những vi khuẩn này thường sử dụng một trong hai con đường khác. Một số *Archaea* (*Thermoproteus*, *Sulfolobus*) và các vi khuẩn *Chlorobium* và *Desulfobacter* sử dụng con đường acid tricarboxylic khử. Ở các vi khuẩn sinh methane, vi khuẩn khử sulfate và các vi khuẩn sinh acetate (các vi khuẩn tạo thành acetate từ CO_2 trong quá trình lên men) lại tồn tại con đường Acetyl-CoA. Chu trình Calvin gặp trong chất nền (stroma) của lục lạp của các VSV nhân thật tự dưỡng. Vi khuẩn lam, một số vi khuẩn nitrate hóa và các *Thiobacillus* chứa các thể vùi, đa diện gọi là carboxysom. Carboxysom chứa enzyme ribulo-1, 5-bisphosphate carboxylase, có thể là vị trí cố định CO_2 hoặc vị trí dự trữ carboxylase và các protein khác.

Các nhóm VSV tham gia trong quá trình chuyển hóa các hợp chất carbon đã góp phần khép kín vòng tuần hoàn vật chất, giữ mối cân bằng vật chất trong thiên nhiên. Từ đó giữ được sự cân bằng sinh thái trong các môi trường tự nhiên. Sự phân bố rộng rãi của các nhóm VSV chuyển hóa các hợp chất carbon còn góp phần làm sạch môi trường, khi môi trường bị ô nhiễm các hợp chất hữu cơ chứa carbon. Người ta sử dụng những nhóm VSV này trong việc xử lý chất thải có chứa các hợp chất carbon hữu cơ như cellulose, tinh bột...

5.4.2. Sự chuyển hóa các hợp chất hữu cơ chứa nitơ do vi sinh vật

Tác dụng chuyển hóa các hợp chất chứa nitơ do vi sinh vật có thể chia làm bốn loại quá trình chính: ammonium hóa, nitrate hóa, phản nitrate hóa và cố định nitơ phân tử.

5.4.2.1. Quá trình ammonium hóa

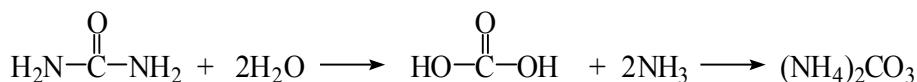
a) Quá trình ammonium hóa urea

Trong quá trình trao đổi protein trong cơ thể người và động vật có hình thành một lượng lớn urea. Nó được thải ra trong nước tiểu. Trong nước tiểu của người có khoảng 2,4% urea. Số urea mà tất cả mọi người thải ra trong một ngày là trên 15.000 tấn. Nếu kể cả động vật thì con số đó gấp trên 10 lần. Ngoài ra, để làm phân người ta còn sản xuất urea theo phương pháp hóa tổng hợp.

Thực vật không sử dụng được urea. Nó phải được chuyển thành muối ammonium thì mới là thức ăn cho cây.

Vi khuẩn phân giải urea có nhiều loại. Chúng được gọi chung là *Urobacterium*. Hầu hết chúng thuộc hai họ *Coccaceae* và *Bacillaceae*. Chúng là vi khuẩn hiếu khí, phát triển tốt trên môi trường có phản ứng kiềm. Chúng có thể sử dụng các loại carbohydrate như đường, tinh bột và các muối của các acid hữu cơ như acetate, citrate... làm nguồn carbon, còn nguồn nitơ thì chúng có thể sử dụng tốt NH₃ hoặc muối ammonium, do thủy phân urea tạo thành.

Cơ chế phản ứng của quá trình phân giải urea do vi khuẩn rất đơn giản. Có thể xem đó là sự khử amide tiến hành dưới tác dụng của enzyme urease:



Muối ammonium carbonate không bền, dễ bị phân giải theo phương trình sau:



b) *Quá trình ammonium hóa protein (sự thối rữa protein)*

Protein là hợp chất hữu cơ phức tạp nhất, có mặt trong tất cả các cơ thể sống. Nó cũng có nhiều trong xác sinh vật, trong các thức ăn và nhiều hàng hóa công nghiệp khác. Quá trình thối rữa protein tiến hành thường xuyên trong tự nhiên: không khí, đất, nước, trong điều kiện hiếu khí cũng như kỵ khí.

* *Vi sinh vật gây thối rữa*

Vi sinh vật gây thối rữa còn gọi là VSV ammonium hóa protein rất phổ biến trong tự nhiên. Chúng bao gồm nhiều vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm. Trong vi khuẩn có nhiều loài có tính chất hô hấp khác nhau. Sau đây ta kể những loài chủ yếu:

(1) Vi khuẩn hiếu khí:

+ *Bacillus mycoides*

Rất phổ biến trong đất. Nó là loại trực khuẩn không lớn lăm (tế bào 5 – 10 × 0,8 – 1,2 µm), cho bào tử hình bầu dục (1,0 – 1,5 × 0,8 – 1,0 µm) nằm lệch tâm. Khi phân hủy protit không tạo thành H₂S. Trên MT đặc chúng tạo thành những khuẩn lạc đặc biệt giống như khuẩn ty thể của nấm (vì vậy nó có tên là mycoides, nghĩa là giống nấm).

+ *Bacillus mesentericus*

Khuẩn lạc thường bám chặt vào MT thạch, có khi dính vào MT, mỏng, nhăn nheo. màu xám nhạt – trắng, màu kem hay màu vàng – nâu. Chúng là những trực khuẩn có bào tử hình bầu dục và kéo dài, có tiên mao chung quanh, thường xếp thành chuỗi. Có hình thành H₂S khi phân giải protein.

+ *Bacillus subtilis*: rất phổ biến trong tự nhiên và gây nên sự phân giải protein rất mạnh. Khuẩn lạc khô, không màu hay có màu xám nhạt trắng, hơi nhăn hay tạo ra lớp màng mịn, lan trên bề mặt thạch có mép nhăn, mép lồi lõm nhiều hay ít, bám chặt vào MT

thạch. Chúng là những trực khuẩn ngắn và nhỏ ($3 - 5 \times 0,6 \mu\text{m}$), bào tử hình bầu dục. Chúng phát triển trên xác thực vật, rơm rạ nên còn có tên là trực khuẩn cỏ khô.

+ *Pseudomonas fluorescens*: trực khuẩn không bào tử. Di động nhờ tiên mao ở đầu. Chúng có thể hình thành sắc tố vàng lục.

+ *Chromobacterium prodigiosum*: trực khuẩn không bào tử, có thể hình thành sắc tố đỏ. Khuẩn lạc của vi khuẩn này trông giống như vết máu.

(2) Vi khuẩn hô hấp tùy tiện:

+ *Proteus vulgaris*: trực khuẩn nhỏ Gram âm, không bào tử, chuyển động rất mạnh. Chúng có khả năng thay đổi hình dạng kích thước khi phát triển trên những môi trường thức ăn khác nhau. Khi phân giải protein chúng làm kiềm hóa môi trường và sinh nhiều H_2S , indole...

+ *Escherichia coli* (còn gọi là trực khuẩn đại tràng): luôn luôn có trong ruột người và động vật, chúng đi vào đất, nước cùng với phân. Chúng là trực khuẩn ngắn, chuyển động không bào tử. Chúng không có khả năng phân giải protein mà chỉ phát triển được trên những sản phẩm thủy phân protein. Trong điều kiện kỵ khí, chúng gây nên sự lên men lactic đặc biệt.

(3) Vi khuẩn kỵ khí:

Pseudomonas putreficans: rất thường gặp, trực khuẩn nhỏ và dài $5 - 6 \mu\text{m}$. Bào tử tương đối lớn ở một đầu. Không có khả năng lên men carbohydrate. Khi phân giải protein tạo thành nhiều khí.

Clostridium sporogenes: khác loài trên là lên men được carbohydrate. Khi phân giải protein tạo thành nhiều H_2S .

(4) Các vi sinh vật khác phân giải protein:

+ Xạ khuẩn: *Streptomyces griseus*, *Str. rimosus*, *Str. fradiae*, *Micromonospora*...

+ Nấm mốc: nhiều loài thuộc chi *Penicillium*, *Aspergillus* (*Asp. oryzae*, *Asp. flavus*, *Asp. niger*...), *Mucor* (*Mucor mucedo*), *Rhizopus*....

* Cơ chế phản ứng của quá trình phân giải protein

Quá trình phân giải protein do VSV có thể chia làm ba giai đoạn:

- Giai đoạn 1: Quá trình phân giải protein bắt đầu bằng sự thủy phân dưới tác dụng của những enzyme protease do VSV tiết ra ngoài môi trường (enzyme ngoại bào). Chỉ có những VSV có loại enzyme này mới có thể tác dụng trực tiếp lên các protein tự nhiên.

Sự thủy phân tiến hành dần dần và tạo thành nhiều sản phẩm trung gian. Các aminoacid là sản phẩm cuối cùng của sự thủy phân đó. Sơ đồ thủy phân như sau:

Protein → polypeptide → peptide → aminoacid

Còn nucleoprotein, dưới tác dụng của VSV gây thối rữa sẽ bị phân giải thành protein đơn giản và acid nucleic. Protein đơn giản sẽ bị thủy phân như trên, còn acid nucleic sẽ phân giải thành H_3PO_4 , đường pentose và một hỗn hợp các base hữu cơ.

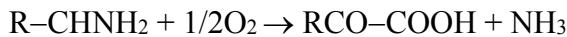
– *Giai đoạn 2:* Các amino acid được tạo thành do quá trình thủy phân, sẽ khuếch tán vào tế bào vi sinh vật và bị deamine hóa để hình thành NH_3 và các chất hữu cơ tương ứng.

Quá trình khử amin có thể tiến hành theo nhiều cách khác nhau dưới tác dụng của các enzyme khác nhau:

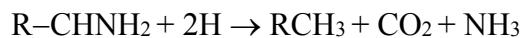
+ Khử amine bằng thủy phân có kèm decarboxyl hóa hoặc không. Hình thành NH_3 oxy, acid hoặc rượu:



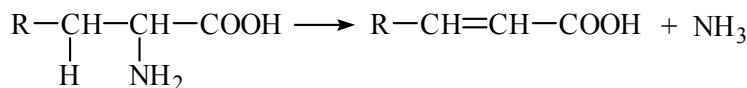
+ Khử amine do oxy hóa: có kèm decarboxyl hóa hoặc không:



+ Khử amine do khử: thường gặp ở các vi khuẩn ký khí. Có kèm decarboxyl hóa hoặc không.

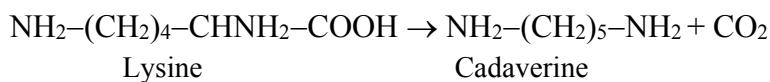


+ Khử amine do mất NH_3 trực tiếp:



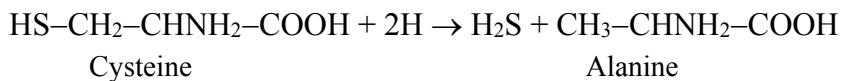
Xem các phản ứng trên ta thấy ngoài NH_3 còn hình thành nhiều phân tử acid hoặc rượu khác nhau tùy theo gốc R của amino acid. Các acid được tạo thành là acid formic, acetic, propionic, butyric và isoamyllic... (chính hỗn hợp các rượu này là dầu khét trong sản xuất rượu ethylic).

Cùng với các amino acid trong protein còn có các diamino acid. Khi phân giải, trước hết các diamino acid sẽ bị decarboxyl hóa để tạo thành các diamine. Ví dụ:



Cadaverine cũng như nhiều base hữu cơ tương tự khác tạo thành khi thối rữa protein, đều có tính độc mạnh, thường được gọi chung là các chất độc xác chết.

+ Khi phân hủy các amino acid có lưu huỳnh thì H_2S sẽ được hình thành. Ví dụ:



Nhiều trường hợp có tạo thành dẫn xuất của H_2S là các mercaptan $\text{R}-\text{SH}$ (thường là methyl mercaptan CH_3-SH), có mùi tanh thối ghê tởm ngay cả khi chỉ có một lượng nhỏ.

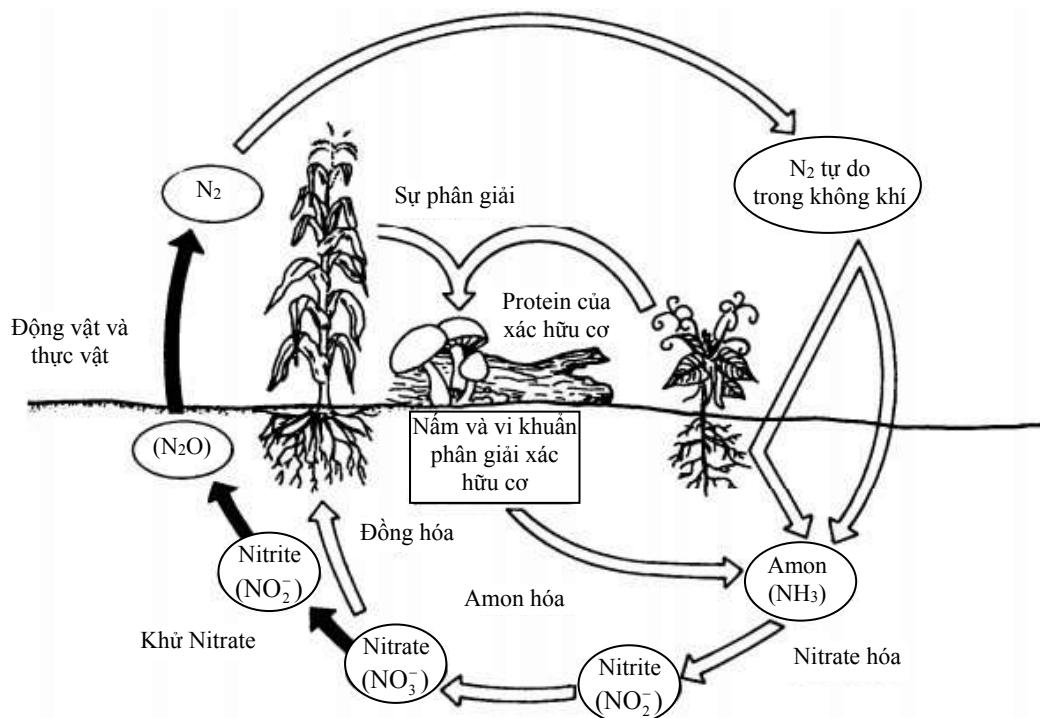
Trong các sản phẩm thủy phân protein luôn có các amino acid thơm (có vòng benzene). Sự phân giải những amino acid thơm này sẽ cho những sản phẩm rất đặc trưng cho quá trình thối rữa protein. Ví dụ từ phenylalanine ta được acid benzoic, tyrosine được phenol; từ tryptophan có thể thành indole và scatol.

Indole và scatol là những sản phẩm thường gặp khi phân giải protein, nó làm cho protein thối rữa có mùi hôi thối rất khó chịu (trong phân). Còn acid indoleacetic lại là một chất sinh trưởng.

– *Giai đoạn 3:* Các hợp chất hữu cơ được tạo thành do sự phân giải sơ bộ amino acid như trên sẽ được tiếp tục chuyển hóa. Sự chuyển hóa này tùy theo loài VSV và điều kiện môi trường mà rất khác nhau.

Trong điều kiện hiếu khí, các hợp chất đó được oxy hóa và có thể được vô cơ hóa hoàn toàn. Trong trường hợp này, sản phẩm cuối cùng của sự phân giải sẽ là các cấu tử cơ bản của protein: NH_3 , CO_2 , H_2O , H_2S , H_3PO_4 .

Trong điều kiện kỵ khí, các sản phẩm phân giải amino acid không được oxy hóa hoàn toàn. Trong môi trường sẽ tích tụ nhiều acid hữu cơ, rượu, amine trong đó có nhiều chất độc và mùi hôi thối.



Hình 5.7. Chu trình sinh hóa địa nitơ

5.4.2.2. Quá trình nitrate hóa

Các muối ammonium được tạo thành trong quá trình ammonium hóa protein, urea, chitin... có thể được cấy trực tiếp hấp thụ, hoặc sẽ được chuyển thành các muối nitrate. Quá trình ammonium hóa muối ammonium thành nitrate gọi là quá trình nitrate hóa. Nitrate hóa được thực hiện do nhiều loại vi khuẩn dinh dưỡng vô cơ đặc biệt, gọi chung là vi khuẩn nitrate hóa.

a) Vi khuẩn nitrate hóa

Người đầu tiên nghiên cứu vi khuẩn nitrate hóa và hoạt động sinh lý của chúng là nhà khoa học Nga Vinogradsky. Ông chứng minh vi khuẩn nitrate hóa cũng như vi khuẩn lưu huỳnh và vi khuẩn sắt là những loài VSV dinh dưỡng vô cơ bằng tổng hợp hóa học. Ông cũng khẳng định quá trình nitrate hóa gồm hai giai đoạn: oxy hóa muối ammonium thành nitrite và oxy hóa nitrite thành nitrate. Hai giai đoạn này được thực hiện do hai loại vi khuẩn khác nhau:

– Vi khuẩn nitrous oxide (N_2O):

Oxy hóa muối ammonium thành nitrite có hai chi vi khuẩn chính là *Nitrosomonas* và *Nitrosospira*. *Nitrosomonas* có hình cầu hoặc hình bầu dục ngắn, Gram âm, không sinh bào tử. Di động được bằng một tiên mao dài. *Nitrosospira* là loại biến đổi nhiều hình thái, nhưng dạng điển hình là trực khuẩn gân giồng dấu phẩy.

– Vi khuẩn oxy hóa nitrite thành nitrate:

Gồm một chi là *Nitrobacter*. Chúng là trực khuẩn nhỏ không có bào tử, Gram âm. Vi khuẩn nitrate hóa có thể sử dụng được CO_2 làm nguồn C. Chúng không cần hợp chất hữu cơ có sẵn. Không những thế hợp chất hữu cơ còn làm úc chế sự phát triển của chúng. Trong phòng thí nghiệm, muốn nuôi cấy vi khuẩn nitrate phải dùng môi trường chỉ chứa những chất vô cơ (để có môi trường đặc có thể dùng gel-silice thay cho thạch).

pH của môi trường cũng có ảnh hưởng đến vi khuẩn và quá trình nitrate hóa. pH thích hợp nhất là 8,5 đối với giai đoạn thứ nhất và 8,3 – 9,3 đối với giai đoạn thứ hai. Khi pH = 6 quá trình nitrate hóa không tiến hành, do đó trong đất chua sẽ không xảy ra quá trình này. Nhiệt độ thích hợp cho vi khuẩn nitrate hóa là 30 – 37 °C.

b) Cơ chế phản ứng của quá trình nitrate hóa.

Quá trình oxy hóa muối ammonium đến nitrate thực hiện qua hai giai đoạn:

– Giai đoạn oxy hóa muối ammonium thành nitrite, có thể biểu thị bằng phương trình tóm tắt như sau:



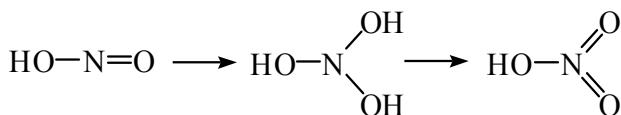
Thực ra quá trình có qua nhiều chặng trung gian, NH_3 mất H và nhận thêm oxy dần dần.



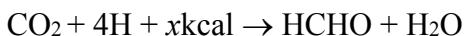
– Giai đoạn oxy hóa nitrite thành nitrate:



Trong quá trình trung gian có tạo thành hydrate của acid nitrite:



Trong cả hai giai đoạn của quá trình nitrate hóa đều có giải phóng nhiều năng lượng. Vì khuẩn nitrate hóa đã sử dụng năng lượng này để tiến hành phản ứng khử CO_2 thành hợp chất hữu cơ song song với các phản ứng oxy hóa NH_3 và HNO_2 . Quá trình khử có thể viết như sau:



c) Ý nghĩa của quá trình nitrate hóa

Quá trình nitrate hóa quan trọng trong nông nghiệp và trong môi trường vì nó biến muối ammonium thành nitrate là nguồn thức ăn N tốt nhất cho cây. Do khả năng dinh dưỡng vô cơ nên vi khuẩn nitrate hóa sống được ở những chỗ tưởng như không thể có sự sống như đá granit, đá tảng ở núi. Nó tham gia vào việc xâm thực đá núi do tác dụng ăn mòn của acid nitric được tạo thành. Chúng phát triển và làm phá hủy một phần tường gạch và kiến trúc bê tông cũng như các phế thải cứng.

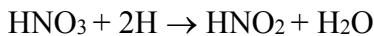
5.4.2.3. Quá trình phản nitrate hóa

Phản nitrate hóa theo nghĩa rộng là bao gồm tất cả những quá trình khử nitrate để tạo thành những hợp chất N có hóa trị nhỏ hơn (như HNO_2 , N_2 , NH_3 ...). Theo nghĩa hẹp, phản nitrate chỉ bao gồm quá trình khử nitrate đến sản phẩm cuối cùng là N_2 . Quá trình phản nitrate hóa trong tự nhiên có hai loại: trực tiếp và gián tiếp.

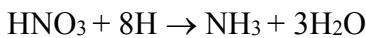
a) Phản nitrate hóa trực tiếp

Xảy ra dưới tác dụng trực tiếp của vi sinh vật. Có thể có ba trường hợp:

– Khử acid nitric thành acid nitrite: nhiều vi khuẩn và nấm hoại sinh có thể khử acid nitric nhưng chỉ đến acid nitrite:

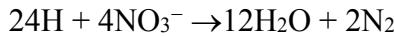
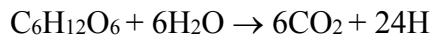


– Một số vi khuẩn có thể tiến hành quá trình khử nitrate đến tận NH_3 :



– Nhiều loại vi sinh vật khác có khả năng khử HNO_3 thành N_2 . Hai loại vi khuẩn hoạt động mạnh nhất trong số này là *Bact. denitrificans* và *Pseudomonas fluorescens*. Chúng là những trực khuẩn chuyển động mạnh, không có bào tử, dinh dưỡng hữu cơ và hô hấp tùy tiện.

Những quá trình khử nitrate đều có ý nghĩa năng lượng. Vì khuẩn phản nitrate hóa đều là VSV hô hấp tùy tiện. Trong điều kiện thoáng khí, chúng dùng O_2 để làm chất nhận H cuối cùng. Trong điều kiện kỵ khí, chúng sẽ sử dụng nitrate làm nhiệm vụ này. Ví dụ, quá trình hô hấp kỵ khí của chúng kết hợp với sự khử nitrate thành N_2 như sau:



Quá trình phản nitrate hóa làm tổn thất đáng kể lượng thức ăn N trong đất, làm thiệt hại cho sản xuất nông nghiệp. Trong đất xốp thoáng khí hoặc hơi chua, quá trình phản nitrate hóa không đáng kể. Nhưng trong những ruộng kỵ khí và khi ủ phân kín thì quá trình này xảy ra mạnh, pH thích hợp của quá trình này là trung tính hoặc kiềm yếu 7 – 8, 2.

b) *Phản nitrate hóa gián tiếp*

Cũng làm tổn thất lượng thức ăn N trong đất vì các hợp chất của N bị chuyển thành N₂. Giai đoạn cuối của quá trình này là những phản ứng hóa học thuận túy xảy ra giữa acid nitrous và các hợp chất amino acid và amide:



Trong quá trình này, vi sinh vật chỉ có tác dụng gián tiếp làm hình thành acid nitrous (phản lớn là do khử nitrate, các amino acid và amide).

Đối với nông nghiệp, quá trình phản nitrate hóa gián tiếp không có tầm quan trọng lớn lắm, vì tác dụng này phải tiến hành trong môi trường acid mà hầu hết đất trồng trọt có phản ứng kiềm.

5.4.2.4. Quá trình cố định nitơ phân tử

Trong không khí có rất nhiều nitơ (N) phân tử, nhưng tuyệt đại đa số sinh vật không sử dụng được nguồn N này. Chỉ có một số VSV là có thể hấp thụ được N₂. Qua hoạt động sống của chúng N₂ sẽ được chuyển thành N hợp chất (protein và các sản phẩm thủy phân protein). Hoạt động này được gọi là sự cố định nitơ phân tử.

Quá trình cố định N₂ có tác dụng rất lớn đến đời sống các sinh vật trên Trái Đất. Trên cơ bản trong nham thạch không chứa hợp chất nitơ. Cho nên nguồn nitơ trong đất hầu như hoàn toàn do tác dụng cố định N₂ của VSV mà hình thành. Hàng năm cây trồng lại lấy đi một lượng N đáng kể. Hợp chất N được hình thành trong quá trình cố định này lại chính là nguồn nitơ chủ yếu bổ sung cho đất.

Các loại VSV cố định N không nhiều lắm, có thể chia làm hai loại lớn như sau:

a) *Vi sinh vật cố định N sống tự do* (không cộng sinh): bao gồm một số vi khuẩn, nấm và tảo. Trong số này quan trọng nhất là các loài thuộc chi *Azotobacter* và loài *Clostridium pasteurianum*.

– *Azotobacter*: Đây là vi khuẩn cố định N sống tự do, hiếu khí, không có bào tử. Chúng đã được phân lập và nuôi cấy thuần khiết từ năm 1901 bởi nhà VSV Hà Lan Beijerinck. Đại diện điển hình của chi này là *Azotobacter chroococcum*.

Do điều kiện nuôi cấy và lứa tuổi khác nhau mà *Azotobacter* có hình thái thay đổi. Lúc còn non *Azotobacter* là những trực khuẩn mập, khi già thì trở thành tế bào hình cầu có giáp mạc xung quanh. Chỉ khi còn non chúng mới di động được nhờ tiên mao, khi tế bào lớn lên khả năng di động mất dần. Chúng không có bào tử.

Azotobacter có thể sử dụng nhiều loại hợp chất hữu cơ làm nguồn thức ăn C. Chúng cũng cần nhiều nguyên tố khoáng, đặc biệt là hai nguyên tố vi lượng bor (B) và molybden (Mo) (molybden cần cho tác dụng cố định N).

Khi sống trong điều kiện không có N hợp chất, *Azotobacter* sẽ dùng N₂ của không khí để biến thành hợp chất N của cơ thể sống. Khi sống trong môi trường đủ thức ăn N hữu cơ hoặc vô cơ thì tác dụng cố định N₂ sẽ rất thấp hoặc không có. *Azotobacter* thích hợp với điều kiện hiếu khí vừa phải và pH trung tính hoặc hơi kiềm. Trong điều kiện thích hợp cứ mỗi khi tiêu thụ 1 g carbohydrate *Azotobacter* có thể cố định được 10 – 15 mg N₂.

Vì *Azotobacter* có khả năng cố định N₂ mạnh mẽ như vậy nên từ cuối thế kỷ XVIII đã có nhiều nước nghiên cứu sử dụng chúng làm phân vi khuẩn (gọi là phân azotobacterin). Việc sử dụng azotobacterin cũng đang phát triển mạnh ở nhiều nước và thu được kết quả. Tuy nhiên, sử dụng azotobacterin không phải là vấn đề tiếp giông đơn giản, mà còn phải tạo điều kiện để chúng phát triển mạnh, cố định được nhiều N₂, nghĩa là sử dụng kỹ thuật liên hoàn.

Để chế tạo azotobacterin, trước hết ta nuôi thật nhiều *Azotobacter* trên môi trường đặc hoặc lỏng có bơm không khí. Sau đó đem trộn chúng với than bùn hoặc các chất nuôi dưỡng khác để chế thành bột azotobacterin.

– *Clostridium pasteurianum* và một số VSV cố định nitơ khác:

Clos. pasteurianum là trực khuẩn ký khí bắt buộc, có bào tử, bào tử nằm ở giữa làm tế bào phình lên như hình thoi.

Clos. pasteurianum là một loại vi khuẩn butyric, chúng có thể sử dụng các carbohydrate thông thường và làm lên men sinh ra acid butyric, acetic, CO₂ và H₂. Chúng có thể sử dụng hợp chất N vô cơ và hữu cơ làm nguồn thức ăn N, khi những hợp chất này đầy đủ thì tác dụng cố định N₂ của chúng hạ thấp hoặc hoàn toàn không có.

Tác dụng cố định N₂ của *Clos. pasteurianum* thấp hơn *Azotobacter*. Cứ mỗi khi tiêu thụ 1 g carbohydrate thì chúng cố định được 2 – 3 mg N₂. Tuy nhiên, *Clos. pasteurianum* có rất nhiều và phân bố rộng rãi hơn *Azotobacter* nên nguồn N₂ mà chúng cố định cho đất là rất quan trọng. Chúng lại phát triển được ở ruộng ngập nước, yêu cầu pH không gắt gao nên thích hợp cho các loại ruộng của ta.

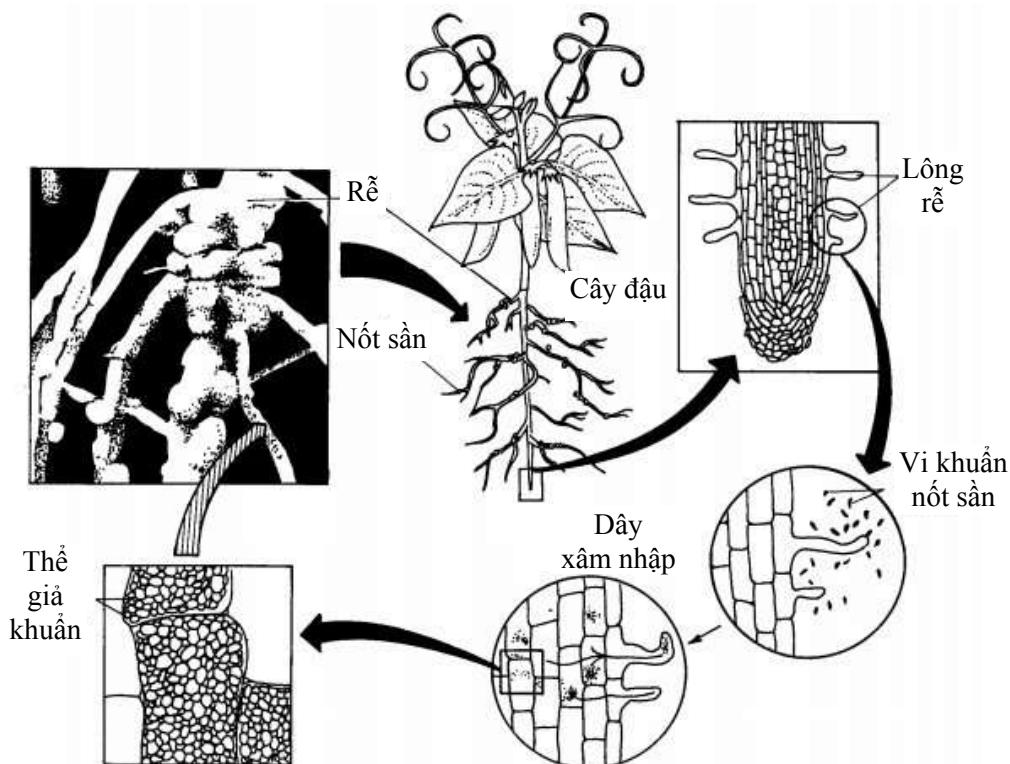
Ngoài hai loài trên, trong các VSV cố định N₂ còn có một số vi khuẩn thuộc chi *Clostridium*, *Bacillus* và *Azotomonas*; nấm thuộc các chi *Phoma*, *Macroporum*, *Cladosporum* và một số loài tảo. Tuy nhiên, vì những loài này phân bố không nhiều và hiệu lực cố định N₂ cũng thấp nên tác dụng thực tế không lớn lắm.

b) Vi khuẩn cố định N₂ cộng sinh

Phần lớn các cây thuộc họ đậu không cần thức ăn hợp chất, chúng có thể sử dụng được N không khí. Nhưng khả năng này không phải bản thân cây họ đậu có mà do những vi khuẩn nốt sần cộng sinh với cây họ đậu mang lại.

– Vi khuẩn nốt sần:

Người đầu tiên chứng minh rằng các cây họ đậu có thể sinh trưởng trong đất không chứa nitơ là H. Hellriegel và H. Wilfarth (1886).



Hình 5.8. Sự hình thành nốt sần ở rễ cây họ đậu.

Năm 1886, M.W. Beijerinck đã phân lập được vi khuẩn từ nốt sần một số cây đậu.

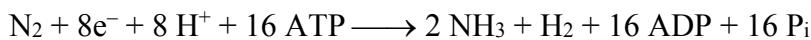
Chi *Rhizobium* (Franck, 1889) là loại vi khuẩn đơn bào ở đất, rất dễ nhầm với *Pseudomonas*, trực khuẩn tự do có kích thước $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$ chuyển động nhờ nhung mao và roi ở cực, hiếu khí. Khi hình thành nốt sần thì trực khuẩn biến dạng (có hiện tượng đa hình thái), nó thay đổi hình dạng tùy theo lứa tuổi và điều kiện sống. Khi còn non chúng là trực khuẩn nhỏ bé, không có bào tử, di động nhờ tiên mao. Trong quá trình phát triển, chúng sẽ chuyển thành những vi khuẩn hình cầu và những dạng phân nhánh hình chữ Y, chữ V gọi là giả khuẩn thể (*Bacteroides*). Khi sống riêng lẻ trong đất hoặc trong môi trường nuôi cây, chúng không có khả năng cố định N₂.

Rhizobium có nhiều loài và có tính chất chuyên tính, nghĩa là mỗi loài chỉ có thể xâm nhập và tạo thành nốt sần trong một số cây họ đậu nhất định. Khi gắp cây họ đậu thích hợp sẽ xâm nhập vào tế bào rễ, kích thích rễ tạo thành những nốt rễ. Nốt sần thường bằng hạt gạo, nốt sần to bằng hạt đậu nhỏ, trong nốt sần chứa đầy vi khuẩn *Rhizobium*. Sau khi hình thành nốt sần, giữa vi khuẩn *Rhizobium* và cây họ đậu làm thành một thể cộng sinh có lợi cho cả hai bên.

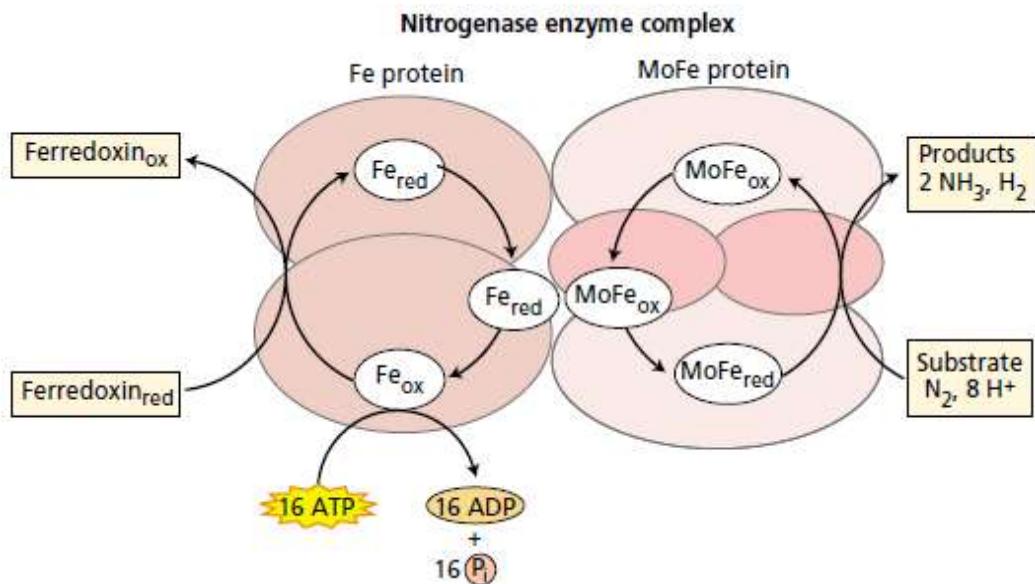
Ngoài các cây họ đậu, một số rễ cây khác cũng có thể cộng sinh với vi khuẩn cố định N₂. Gần đây người ta còn thấy nốt sần ở lá một vài loài cây nhiệt đới. Trong nốt sần đó cũng chứa vi khuẩn cố định N₂ gần giống ở rễ.

– Phức enzyme nitrogenase cố định nitơ:

Sự cố định nitơ tạo ra ammonia (NH₃) từ nitơ phân tử nhờ phức hệ enzyme nitrogenase xúc tác. Phản ứng tổng quát là:



Phức enzyme nitrogenase có thể được tách thành hai phần – protein Fe và protein MoFe – cả hai không phần nào tự nó có hoạt tính xúc tác (hình 5.9).



Hình 5.9. Phản ứng do nitrogenase xúc tác. Ferredoxin khử protein Fe. Sự gắn và thủy phân ATP với protein Fe được cho là làm thay đổi hình dạng của protein Fe tạo điều kiện cho phản ứng oxy hóa khử. Protein Fe khử protein MoFe và protein MoFe khử N₂ (Taiz, 2002).

+ Protein Fe là thành phần nhỏ hơn và có hai tiểu đơn vị giống nhau từ 30 đến 72 kDa/tiểu đơn vị tùy thuộc vào cơ thể. Mỗi tiểu đơn vị chứa một cụm/nhóm (cluster) sắt – lưu huỳnh (4 Fe và 4 S²⁻) tham gia các phản ứng oxy hóa khử trong quá trình biến đổi N₂ thành NH₃. Protein Fe bị bắt hoạt không thuận nghịch bởi O₂ với thời gian bán phân hủy điển hình là 30 đến 45 giây.

+ Protein MoFe có bốn tiểu đơn vị, tổng KLPT từ 180 đến 235 kDa tùy thuộc vào loài. Mỗi tiểu đơn vị có hai nhóm Mo–Fe–S. Protein MoFe cũng bị bắt hoạt bởi oxy, với thời gian bán phân hủy trong không khí 10 phút.

Trong phản ứng khử nitơ tổng quát (xem hình 5.9), ferredoxin đóng vai trò chất cho điện tử đối với protein Fe, đèn lượt nó thủy phân ATP và khử protein MoFe. Sau đó protein MoFe có thể khử nhiều chất mặc dù trong điều kiện tự nhiên nó chỉ phản ứng với N₂ và H⁺. Một trong các phản ứng do nitrogenase xúc tác là khử acetylene thành ethylene được sử dụng để đánh giá hoạt tính của nitrogenase.

– Phân bón nốt sần (nitragin):

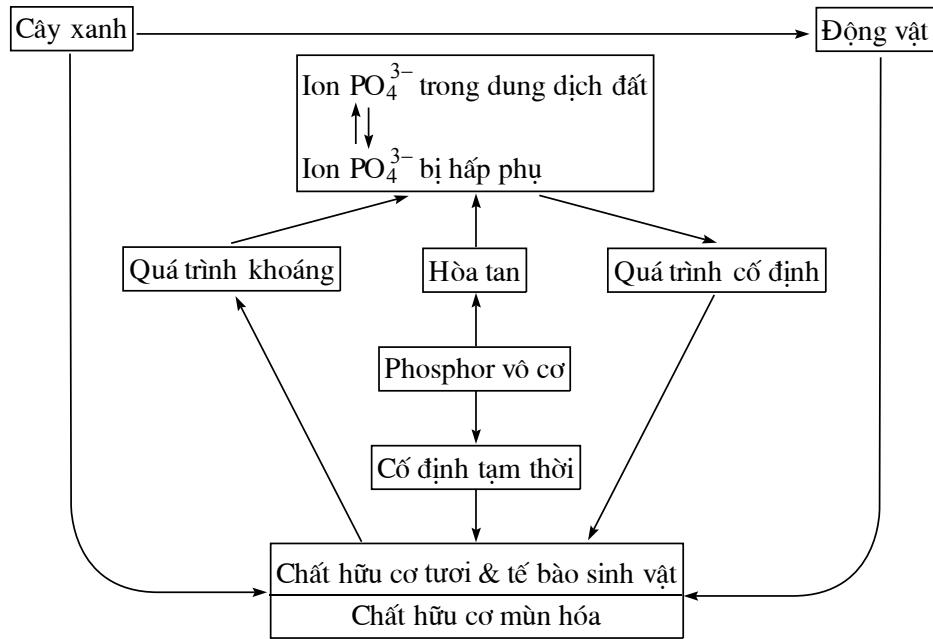
Vi khuẩn nốt sần có ý nghĩa hết sức to lớn trong nông nghiệp. Cường độ cố định N₂ cộng sinh lớn hơn nhiều so với cường độ cố định N₂ không cộng sinh. Sau khi trồng các cây họ đậu, đất giàu thêm N rất nhiều. Chính vì vậy, từ đầu thế kỷ XX, người ta nghiên cứu sử dụng phân bón với mục đích là để tiếp giống nhân tạo, làm cho đất không chứa vi khuẩn nốt sần thích ứng sẽ có vi khuẩn thích ứng, làm cho cây họ đậu không sinh nốt sần sẽ có thể sinh nốt sần và những cây có thể sinh nốt sần thì càng sinh nhiều hơn, cố định N₂ càng mạnh mẽ hơn.

Cách sử dụng phân bón nitragin là đem trộn phân với hạt giống, rồi để khô, sau đó đem gieo. Cũng có thể dùng nốt sần tốt, nghiền nát để trộn với hạt giống. Khi sử dụng có thể tăng sản lượng cây họ đậu lên 15 – 20%.

5.4.3. Sự chuyển hóa các hợp chất chứa phosphor của vi sinh vật

5.4.3.1. Vòng tuần hoàn phosphor trong tự nhiên

Trong tự nhiên, P nằm trong nhiều dạng hợp chất khác nhau. P hữu cơ có trong cơ thể động vật và thực vật, được tích luỹ trong đất khi động vật và thực vật chết đi. Những hợp chất phosphor hữu cơ này được VSV phân giải tạo thành các hợp chất phosphor vô cơ khó tan, một số ít được tạo thành dạng dễ tan. Các hợp chất phosphor vô cơ tan còn có nguồn gốc từ những quặng thiên nhiên như apatit, phosphorit, phosphor sắt, phosphate nhôm... Những hợp chất này rất khó hòa tan và cây trồng không thể hấp thụ trực tiếp được. Cây trồng chỉ có thể hấp thu được khi chúng được chuyển hóa thành dạng dễ tan. Quá trình này được thực hiện một phần quan trọng là nhờ nhóm VSV phân hủy lân vô cơ. Các muối của acid phosphoric dạng dễ tan được cây trồng hấp phụ và chuyển thành các hợp chất phosphor hữu cơ trong cơ thể thực vật. Động vật và người sử dụng các sản phẩm thực vật làm thức ăn lại biến phosphor hữu cơ của thực vật thành P hữu cơ của động vật và người. Người, động vật và thực vật chết đi để lại P hữu cơ trong đất. Vòng tuần hoàn của các dạng hợp chất phosphor trong tự nhiên cứ thế diễn ra. VSV đóng một vai trò quan trọng trong vòng tuần hoàn đó. Nếu như thiếu sự hoạt động của một nhóm VSV nào đó thì sự chuyển hóa của vòng tuần hoàn sẽ bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Vòng tuần hoàn của các dạng phosphor trong tự nhiên được biểu diễn trong sơ đồ hình 5.10.



Hình 5.10. Vòng tuần hoàn phosphor trong tự nhiên.

5.4.3.2. Sự phân giải lân hữu cơ do vi sinh vật

a) Các dạng lân hữu cơ thường gặp trong đất

Trong đất các dạng lân hữu cơ thường gặp là: Phytin, acidnucleic, nucleoprotein, phospholipid.

– Phytin và các chất họ hàng:

Phytin là muối Ca và Mg của acid phytic. Trong đất những chất có họ hàng với phytin là inositol, inositol monophosphate, inositol triphosphate. Tất cả đều có nguồn gốc thực vật. Phytin và những chất có cùng họ hàng chiếm trung bình từ 40 – 80% phosphor hữu cơ trong đất.

– Acid nucleic và nucleoprotein:

Những acid nucleic và nucleoprotein trong đất đều có nguồn gốc thực vật hoặc thực vật và nhất là vi sinh vật. Hàm lượng của chúng trong đất khoảng < 10%.

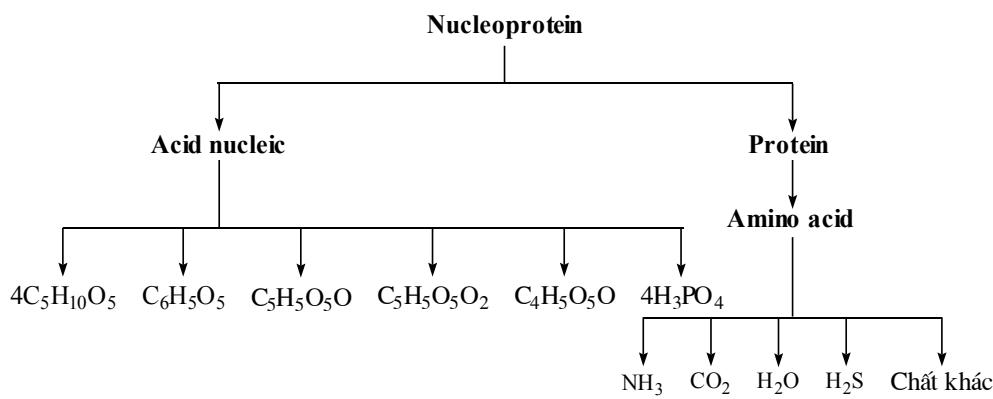
– Phospholipid: Sự kết hợp giữa lipid và phosphate không nhiều trong đất.

b) Vi sinh vật

Chi *Bacillus*: *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. malaberensis*.

B. megaterium không những có khả năng phân giải hợp chất lân vô cơ mà còn có khả năng phân giải hợp chất lân hữu cơ. Người ta còn dùng *B. megaterium* làm phân vi sinh vật.

Ngoài ra còn các chi *Serratia*, *Proteus*, *Arthrobacter*... Nấm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cunninghamella*... Xạ khuẩn: *Streptomyces*.



Hình 5.11. Cơ chế phân giải nucleoprotein.

c) Cơ chế phân giải

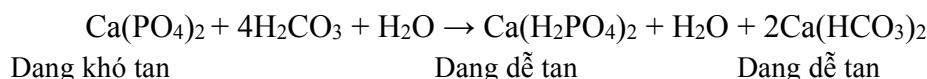
Nucleoprotein → nuclein → acid nucleic → nucleotid → H₃PO₄

Nhiều vi sinh vật đất có men dephosphorylase phân giải phytin theo phản ứng (hình 5.11).

5.4.3.3. Sự phân giải lân vô cơ do vi sinh vật

Các hợp chất lân vô cơ được hình thành do quá trình phân giải lân hữu cơ (còn gọi là quá trình khoáng hóa lân hữu cơ), phần lớn là các muối phosphate khó tan. Cây trồng không thể hấp thu được những dạng khó tan này. Các hợp chất lân khó tan còn nằm trong các chất khoáng thiên nhiên như các mỏ Apatit, phosphoric... Nếu không có quá trình phân giải các hợp chất phosphor khó tan biến thành dạng dễ tan thì hàm lượng phosphor tổng số trong đất đấu có nhiều cũng trở thành vô dụng.

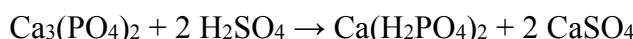
Về cơ chế của quá trình phân giải phosphor vô cơ do VSV cho đến nay vẫn còn nhiều tranh cãi. Nhưng đại đa số các nhà nghiên cứu đều cho rằng: sự sản sinh acid trong quá trình sống của một số nhóm VSV đã làm cho nó có khả năng chuyển các hợp chất phosphor từ dạng khó tan sang dạng có thể hòa tan. Đa số các VSV có khả năng phân giải lân vô cơ đều sinh CO_2 trong quá trình sống, CO_2 sẽ phản ứng với H_2O có trong môi trường tạo thành H_2CO_3 . H_2CO_3 sẽ phản ứng với phosphate khó tan tạo thành phosphate dễ tan theo phương trình sau:



Các vi khuẩn nitrat hóa sống trong đất cũng có khả năng phân giải lân vô cơ do nó có khả năng chuyển NH_3 thành NO_2^- rồi NO_3^- . NO_3^- sẽ phản ứng với phosphate khó tan tạo thành dạng dễ tan:



Các vi khuẩn sulfate hóa cũng có khả năng phân giải phosphate khó tan do sự tạo thành H_2SO_4 trong quá trình sống.



Ngoài ra, các nhóm VSV có khả năng tạo thành các acid hữu cơ trong quá trình sống cũng có thể làm cho dạng phosphate khó tan chuyển thành dạng dễ tan.

Tuyệt đại đa số các VSV phân hủy lân vô cơ trong quá trình sống đều làm giảm pH của môi trường. Tuy nhiên, gần đây có một số tác giả đã công bố tìm ra một vài chủng vi khuẩn phân giải lân mà trong quá trình nuôi cấy không làm giảm pH môi trường.

Rất nhiều VSV có khả năng phân giải lân vô cơ, trong đó nhóm vi khuẩn được nghiên cứu nhiều hơn cả. Các loài có khả năng phân giải mạnh là *Bacillus megatherium*, *B.butyricus*, *B.mycoides*, *Pseudomonasradiobacter*, *P.gracilis*... Trong nhóm vi nấm thì *Aspergillus niger* có khả năng phân giải mạnh nhất. Ngoài ra một số xạ khuẩn cũng có khả năng phân giải lân vô cơ.

5.4.4. Khả năng chuyển hóa các hợp chất chứa lưu huỳnh của vi sinh vật

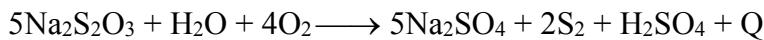
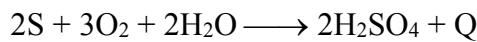
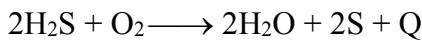
5.4.4.1. Vòng tuần hoàn lưu huỳnh trong tự nhiên

Cũng như phosphor, lưu huỳnh là một trong những chất dinh dưỡng quan trọng của cây trồng. Trong đất nó thường ở dạng các hợp chất muối vô cơ như CaSO₄, Na₂SO₄, FeS₂, Na₂S..., một số ở dạng hữu cơ. Trong cơ thể sinh vật, S nằm trong thành phần của các amino acid chứa lưu huỳnh như methionine, cysteine và trong nhiều loại enzyme quan trọng. Thực vật hút các hợp chất S vô cơ trong đất chủ yếu dưới dạng SO₄²⁻ và chuyển sang dạng S hữu cơ của tế bào. Động vật và người sử dụng thực vật làm thức ăn cũng biến S của thực vật thành S của động vật và người. Khi động thực vật chết đi để lại một lượng lưu huỳnh hữu cơ trong đất. Nhờ sự phân giải của VSV, S hữu cơ sẽ được chuyển hóa thành H₂S. H₂S và các hợp chất vô cơ khác có trong đất sẽ được oxy hóa bởi các nhóm vi khuẩn tự dưỡng thành S và SO₄²⁻, một phần được tạo thành S hữu cơ của tế bào sinh vật. SO₄²⁻ lại được thực vật hấp thụ, cứ thế vòng chuyển hóa các hợp chất lưu huỳnh diễn ra liên tục. Trong đó các nhóm VSV đóng một vai trò quan trọng không thể thiếu.

5.4.4.2. Sự oxy hóa các hợp chất lưu huỳnh

a) Sự oxy hóa các hợp chất lưu huỳnh do vi khuẩn tự dưỡng hóa năng

Trong nhóm vi khuẩn tự dưỡng hóa năng có một số loài có khả năng oxy hóa các hợp chất lưu huỳnh vô cơ như Thiosulfate, khí sulfur hydro và lưu huỳnh nguyên chất thành dạng SO₄²⁻ theo các phương trình sau:



H₂SO₄ sinh ra làm pH đất hạ xuống (diệt trừ được bệnh thối do *Streptomyces* gây ra và bệnh ghẻ khoai tây do pH thấp vi khuẩn không sống được).

Năng lượng sinh ra trong quá trình oxy hóa trên được VSV sử dụng để đồng hóa CO₂ tạo thành đường. Đồng thời một số ít hợp chất dạng S cũng được đồng hóa tạo thành S hữu cơ của tế bào vi khuẩn. Các loài vi khuẩn có khả năng oxy hóa các hợp chất lưu huỳnh theo

phương thức trên là *Thiobacillus thioparus* và *Thiobacillus thioxidans*. Cả hai loài này đều sống được ở pH thấp, thường là pH = 3, đôi khi ở pH = 1 – 1,5 hai loài này vẫn có thể phát triển. Nhờ đặc điểm này mà người ta dùng hai loài vi khuẩn trên làm tăng độ hòa tan của apatit.

Ngoài hai loài vi khuẩn trên còn có hai loài vi khuẩn khác có khả năng oxy hóa các hợp chất S vô cơ, đó là *Thiobacillus denitrificans* và *Begiatra minima*. *Thiobacillus denitrificans* có khả năng vừa khử nitrat vừa oxy hóa S theo các phương trình sau:



Vi khuẩn *Begiatra minima* có thể oxy hóa H₂S hoặc S. Trong điều kiện có nhiều H₂S nó sẽ oxy hóa H₂S tạo thành S tích lũy trong tế bào. Trong điều kiện thiếu H₂S, các hạt S sẽ được oxy hóa đến khi S dự trữ hết thì vi khuẩn chết hoặc ở trạng thái tiềm sinh.

b) Sự oxy hóa các hợp chất S do vi khuẩn tự dưỡng quang năng

Một số nhóm vi khuẩn tự dưỡng quang năng có khả năng oxy hóa H₂S tạo thành SO₄²⁻. H₂S đóng vai trò chất cho điện tử trong quá trình quang hợp của vi khuẩn. Các vi khuẩn *Thiodaceae chlorobacteriae* thường oxy hóa H₂S tạo C₆H₁₂O₆, H₂SO₄ và S.

Ở nhóm vi khuẩn trên, S được hình thành không tích luỹ trong cơ thể mà ở ngoài môi trường.

5.4.4.3. Sự khử các hợp chất lưu huỳnh vô cơ do vi sinh vật

Ngoài quá trình oxy hóa, trong đất còn có quá trình khử các hợp chất S vô cơ thành H₂S. Quá trình này còn gọi là quá trình phản sulfate hóa. Quá trình này được tiến hành ở điều kiện kỵ khí, ở những tầng nước sâu. Nhóm VSV tiến hành quá trình này gọi là nhóm vi khuẩn phản sulfate hóa:



Ở đây chất hữu cơ đóng vai trò cung cấp hydro trong quá trình khử SO₄ có thể là đường hoặc các acid hữu cơ hoặc các hợp chất hữu cơ khác. H₂SO₄ sẽ bị khử dần tới H₂S theo sơ đồ hình 5.12.



Hình 5.12. Vòng tuần hoàn lưu huỳnh trong tự nhiên.

Quá trình phản sulfate hóa dẫn đến việc tích luỹ H₂S trong môi trường làm ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến đời sống của thực vật và động vật trong môi trường đó. Lúa mọc trong điều kiện khí có quá trình phản sulfate hóa mạnh sẽ bị đen rẽ, gây ảnh hưởng xấu đến sinh trưởng và phát triển.

5.5. VAI TRÒ CỦA VI SINH VẬT TRONG ĐẤT

Trong môi trường đất, các VSV thường tổng hợp các chất cần thiết cho sự phát triển của cây trồng và tăng thêm nguồn dinh dưỡng cho đất. Ví dụ các vi khuẩn trong đất như *Azotobacter*, *Rhizobium*, vi khuẩn lam *Cyanobacteria*, xạ khuẩn *Frankia*... tổng hợp chất đạm hữu cơ từ nitơ của khí quyển, góp phần cung cấp chất dinh dưỡng N hữu cơ cho cây và hợp chất N hữu cơ, vô cơ cho đất.

Tăng cường sự phân giải các hợp chất hữu cơ trong đất, góp phần hình thành chất mùn trong đất để tăng độ phì nhiêu cho đất.

Tăng cường sự chuyển hóa các hợp chất vô cơ trong đất. Ví dụ vi khuẩn nitrate hóa *Nitrosomonas*, hay vi khuẩn nitrite hóa *Nitrobacter* tạo thành các muối nitrite và nitrate. Các vi khuẩn tự khác trong môi trường đất tham gia vào chuyển hóa các chất P, S và các chất khoáng khác.

Tác dụng chuyển hóa trên có lợi cho sự hấp thụ chất dinh dưỡng khoáng của cây, đồng thời cũng tạo nên những biến đổi về mặt lý hóa của đất như độ pH, độ thoáng khí...

Trong đất có nhiều loại VSV gây bệnh như: vi khuẩn uốn ván (*Clostridium tetani*), vi khuẩn gây bệnh than (*Bacillus anthracis*)... Đất dễ bị nhiễm các VSV gây bệnh từ chất thải của người và động vật. Khi VSV gây bệnh vào đất, chúng phát tán nhò nước, nhò gió... Do đó, đất là môi trường truyền bệnh rất nguy hiểm nếu như không có biện pháp xử lý ngăn ngừa thích hợp.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Đất là môi trường sống tự nhiên của vi sinh vật, các loài động vật và hỗ trợ sự sinh trưởng của thực vật. Đất được cấu thành bởi ba thành phần: rắn, lỏng và khí.

Vi sinh vật trong đất vô cùng phong phú cả về số lượng và thành phần loài. Các yếu tố sinh học và lý hóa học ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật đất. Vi sinh vật đất có quá trình thích nghi cao để đáp ứng tốt các điều kiện trong đất.

Vi sinh vật đất bao gồm: vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn cổ, nấm, tảo, động vật nguyên sinh, phage và virus. Chúng đóng vai trò quan trọng trong chu trình chuyển hóa các chất trong tự nhiên, tăng nguồn dinh dưỡng, phân giải các hợp chất hữu cơ, tăng độ phì cho đất, chuyển hóa chất vô cơ. Một số vi sinh đất là mầm bệnh cho người, động và thực vật như: vi khuẩn uốn ván (*Clostridium tetani*), vi khuẩn gây bệnh than (*Bacillus anthracis*)...

Có thể nói VSV đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ, vô cơ khó tan thành các chất dễ tan (quá trình chuyển hóa carbon, nitơ,

phosphor, lưu huỳnh, mangan, sắt,...) cung cấp dinh dưỡng cho cây, cải tạo và nâng cao độ phì nhiêu của đất.

Chính những lợi ích to lớn của VSV, con người đã sử dụng các nguồn VSV này để sản xuất ra các chế phẩm như phân bón, các chất kích thích, thuốc bảo vệ thực vật...

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Trình bày hệ vi sinh vật đất và vai trò của chúng trong bảo vệ môi trường?
2. Thế nào là sự ammonium hóa protein? Vi sinh vật tham gia vào quá trình đó có đặc điểm gì chung không?
3. Những điểm giống và khác nhau giữa hai quá trình nitrate hóa và phản nitrate hóa? Ý nghĩa thực tiễn của hai quá trình trên?
4. Các nhóm vi sinh vật cố định đạm? Ý nghĩa thực tiễn của việc nghiên cứu vi sinh vật cố định đạm?
5. Các loại phân bón vi sinh vật? Cơ sở khoa học của việc sản xuất và sử dụng các loại phân bón vi sinh vật?
6. Vai trò của vi khuẩn cố định đạm sống tự do *Azotobacter* và *Clostridium* đối với sản xuất nông nghiệp? Khi sử dụng Azotobacterin, Nitragin cần lưu ý những điểm gì? Vì sao?
7. Các dạng lân ở trong đất? Vai trò của vi sinh vật tham gia vào quá trình chuyển hóa lân trong tự nhiên?
8. Các dạng lưu huỳnh ở trong đất? Vai trò của VSV tham gia vào quá trình chuyển hóa S trong đất?
* *Chọn một đáp án đúng nhất*
9. Yếu tố nào sau đây không được các vi sinh vật đất sử dụng để hỗ trợ sinh trưởng của chúng:
 - a. Độ ẩm chứa trong các lỗ của đất.
 - b. Các chất dinh dưỡng hòa tan liên kết với các hạt đất hoặc trong các lỗ.
 - c. Các chất hữu cơ được giải phóng từ rễ thực vật.
 - d. Tất cả các yếu tố trên đều được sử dụng để trợ giúp sinh trưởng của các VSV đất.
10. Đất bao quanh rễ thực vật được gọi là:
 - a. Tầng đất có nhiệt độ biến đổi; b. Vùng rễ; c. Tầng đất xốp; d. Tầng đất biến nhiệt.
11. Vi sinh vật đất nào sau đây tác động lên khí quyển?
 - a. Nguyên sinh động vật ăn vi sinh vật.
 - b. Các enzyme được giải phóng khỏi vi sinh vật bị dung giải.
 - c. Cả a và b đều đúng.
 - d. Cả a và b đều không đúng.

* *Diễn vào chỗ trống*

12. Đất lúc đầu được bắt nguồn từ sự phong hóa đá hoặc các nguyên liệu hữu cơ khác được gọi là.....
13. là một hỗn hợp phức tạp của các nguyên liệu hữu cơ chết thường gặp trong các loại đất

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. **Kiểm soát sinh học** (*Biological control*): hiện tượng số lượng cá thể của một quần xã bị số lượng cá thể của quần xã khác kìm hãm.
2. **Thế năng oxy hóa khử** (E_h): đại lượng đo mức độ oxy hóa hay khử cơ chất trong môi trường, tính bằng volt hoặc millivolt (V hoặc mV).
3. **Thế nước trong đất** (*Soil water potential*): là số đơn vị công cần thiết để chuyển một lượng nước nhỏ từ độ cao và áp suất đặc trưng đến một điểm khác trong hệ thống xốp của đất.
4. ***Thiobacillus thiooxidans*** có khả năng oxy hóa lưu huỳnh thành sulfite với pH tối ưu từ 2 – 3.

Chương 6

VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG KHÔNG KHÍ

Mục tiêu

- *Nắm được môi trường không khí, sự phân bố và tác hại của ô nhiễm không khí.*
- *Phân biệt được sol khí và sol khí sinh học.*
- *Hiểu được chu trình vi sinh vật trong không khí.*
- *Nêu được các yếu tố ảnh hưởng đến vi sinh vật không khí.*
- *Hiểu được các biện pháp kiểm soát vi sinh vật không khí.*

6.1. MÔI TRƯỜNG KHÔNG KHÍ

Không khí là môi trường gần như không có chất dinh dưỡng cho vi sinh vật phát triển, thêm vào đó lại có ánh sáng mặt trời càng làm cho vi sinh vật ít có khả năng nhân lên và tồn tại lâu trong không khí. Trong không khí, ngoài bụi còn có vi khuẩn, vi nấm, virus, ký sinh trùng..., các thành phần này liên quan mật thiết với nhau. Bụi càng nhiều thì số lượng và chủng loại vi sinh vật càng phong phú. Tuy có nhiều chủng loại nhưng số vi sinh vật sống sót rất ít, chỉ có vi khuẩn có bào tử, vi khuẩn có sinh sắc tố nấm... có thể tồn tại một thời gian.

Số lượng vi sinh vật có trong không khí tùy thuộc vào môi sinh ở từng khu vực: không khí ở thành thị có nhiều vi sinh vật hơn nông thôn, không khí ở bệnh viện có nhiều vi sinh vật gây bệnh hơn ở các nơi khác... Một số vi sinh vật gây bệnh đường hô hấp như vi khuẩn lao, trực khuẩn bạch hầu, liên cầu tan máu nhóm A, tụ cầu vàng, virus cúm, virus sởi... từ bệnh nhân, từ người nhiễm bệnh không triệu chứng bài tiết ra không khí và làm lây lan từ người này sang người khác.

Sự phân bố của vi sinh vật trong môi trường không khí phụ thuộc vào ba yếu tố sau:

- Phụ thuộc khí hậu trong năm:

Thường vào mùa đông, lượng vi sinh vật hầu như ít nhất so với các mùa khác trong năm. Ngược lại lượng vi sinh vật nhiều nhất vào mùa hè. Có lẽ do độ ẩm không khí, nhiệt độ cao, gió mưa, do các hoạt động khác của thiên nhiên.

- Phụ thuộc vùng địa lý:

+ Lượng vi sinh vật trong không khí gần khu quốc lộ có nhiều xe qua lại bao giờ cũng nhiều hơn vùng khác.

+ Không khí vùng núi và vùng biển bao giờ cũng ít vi sinh vật hơn vùng khác. Đặc biệt trong không khí ngoài biển, lượng vi sinh vật rất ít.

+ Ngoài ra nó còn phụ thuộc vào chiều cao lớp không khí. Không khí càng cao so với mặt đất, lượng vi sinh vật càng ít.

– Phụ thuộc hoạt động sống của con người:

Con người và động vật là một trong những nguyên nhân gây ô nhiễm không khí. Ví dụ như trong giao thông, vận tải, trong chăn nuôi, trong sản xuất công nông nghiệp, do bệnh tật hoặc do các hoạt động khác của con người và động vật mà lượng vi sinh vật tăng hay giảm.

Trong những năm qua, với xu thế đổi mới và hội nhập, Việt Nam đã tạo được những xung lực mới cho quá trình phát triển, vượt qua tác động của suy thoái toàn cầu và duy trì tỷ lệ tăng trưởng kinh tế hàng năm với mức bình quân 5,7%/năm. Tuy nhiên, nước ta vẫn đang phải đổi mới với rất nhiều thách thức, trong đó có vấn đề ô nhiễm môi trường không khí (MTKK). Ô nhiễm MTKK có tác động tiêu cực đến sức khỏe con người, đẩy nhanh quá trình lão hóa, suy giảm chức năng hô hấp, gây các bệnh như: hen suyễn, ho, viêm mũi, viêm họng, viêm phế quản, viêm phổi, thậm chí gây ung thư phổi; suy nhược thần kinh, tim mạch, làm giảm tuổi thọ con người. Nguy hiểm nhất là có thể gây ra các bệnh ung thư.

Bên cạnh đó, các chất gây ô nhiễm không khí (ONKK) chính là thủ phạm gây ra hiện tượng lăng đọng và mưa acid, gây hủy hoại các hệ sinh thái, làm giảm tính bền vững của các công trình xây dựng và các dạng vật liệu. Ô nhiễm môi trường còn ảnh hưởng đến các hệ sinh thái tự nhiên và đẩy nhanh biến đổi khí hậu. Sự gia tăng nồng độ các chất gây ô nhiễm như CO_2 , CH_4 , NOx ... trong MTKK gây ra hiện tượng hiệu ứng nhà kính và làm tăng nhanh quá trình biến đổi khí hậu.



Hình 6.1. *Sự hình thành mưa acid (trái)* (Nguồn: Khoaahocngaynay.com, 2010);
Mưa acid xuất hiện bất thường ở Bắc Giang, Việt Nam (24/10/2014) (Ảnh Quốc Cường).

Chất lượng môi trường không khí chịu ảnh hưởng của các yếu tố khí hậu, thời tiết, độ che phủ cây xanh và các hoạt động kinh tế – xã hội. Để giải quyết vấn đề ONKK, cần xây dựng các giải pháp, lựa chọn các ưu tiên và thực hiện có lộ trình chặt chẽ. Các giải pháp cần được xây dựng đồng bộ và toàn diện để giải quyết nhu cầu quản lý và bảo vệ MTKK về lâu dài.

6.2. SOL KHÍ VÀ SOL KHÍ SINH HỌC

6.2.1. Sol khí

Sol khí – hay là aerosol – là hệ keo của các hạt chất rắn hoặc các giọt chất lỏng lơ lửng trong không khí hay chất khí khác. Sol khí gây nguy hiểm cho sức khỏe con người do được hấp thụ qua đường hô hấp và tích tụ trong đường mũi hoặc cuống phổi. Các sol khí nhỏ dễ dàng di chuyển sâu trong hệ hô hấp gây nguy hiểm hơn các hạt lớn. Cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (USEPA) đã chia các hạt bụi trong không khí thành hai loại: (1) PM₁₀ gồm những hạt có đường kính nhỏ hơn hoặc bằng 10 µm; (2) MP_{2,5} gồm những hạt có đường kính nhỏ hơn hoặc bằng 2,5 µm.

Trong không khí, nồng độ các hạt được tính bằng µg/m³. Cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ cũng đưa ra tiêu chuẩn không khí quốc gia như sau: PM₁₀ có nồng độ 150 µg/m³ trong 24 giờ và 50 µg/m³ trong năm, PM_{2,5} có nồng độ 65 µg/m³ trong 24 giờ và 15 µg/m³ trong năm.

6.2.2. Sol khí sinh học

Sol khí sinh học: sol khí kết hợp với các độc tố, các phần của tế bào hoặc các mầm bệnh gồm virus hoặc vi khuẩn. Thành phần sol khí sinh học phụ thuộc vào các loại nhân tố kết hợp khác nhau, phụ thuộc loại vi sinh vật, loại độc tố hay loại hạt kết hợp với sương hoặc hạt bụi. Thành phần của sol khí sinh học có thể lỏng, rắn hoặc kết hợp cả hai thể trên.

Sol khí sinh học có kích thước luôn thay đổi, thường có đường kính từ 0,02 đến 100 µm. Căn cứ vào kích thước, có ba loại sol khí sinh học: (1) thể hạt nhân: có đường kính nhỏ hơn 0,1 µm; (2) thể tích tụ: có đường kính từ 0,1 đến 0,2 µm; (3) thể lớn: có đường kính lớn hơn 0,2 µm.

6.3. CHU TRÌNH VI SINH VẬT KHÔNG KHÍ

Chu trình vi sinh vật không khí gồm:

- Thải các sol khí sinh học vào trong không khí;
- Phát tán các sol khí sinh học;
- Lắng đọng các sol khí sinh học.

6.3.1. Quá trình thải

Thời điểm các sol khí được hòa lẫn vào trong không khí được gọi là quá trình thải. Các sol khí sinh học được thải vào không khí chủ yếu từ đất và nước. Bằng tính toán mô hình (*in silico*), số lượng các hạt có mang vi khuẩn trên toàn cầu từ $7,6 \times 10^{23}$ đến $3,5 \times 10^{24}$.

Cơ chế thải các hạt vào trong không khí bao gồm: sự nhiễu loạn không khí gây ra bởi người, động vật và máy móc; quá trình tạo, lưu và xử lý chất thải; quá trình tự nhiên như dòng chảy của nước, gió thổi trên bề mặt chất ô nhiễm rắn hoặc lỏng và sự phóng thích bào tử nấm trong chu trình sống tự nhiên.

Các hạt bụi không khí có thể thải ra từ các nguồn khác nhau: từ một điểm, một dãy hay một khu vực.

6.3.2. Phát tán

Sự di chuyển của không khí phát tán các sol khí sinh học từ điểm này sang điểm khác. Phát tán sol khí sinh học được phân loại theo thời gian và khoảng cách.

- Phát tán cực nhỏ: thời gian phát tán dưới 10 phút và khoảng cách dưới 100 m. Thường xảy ra trong một tòa nhà hoặc một không gian xác định.
- Phát tán nhỏ: thời gian phát tán dưới từ 10 đến 60 phút và khoảng cách dưới 100 m đến 1 km.
- Phát tán lớn: thời gian phát tán hàng ngày và khoảng cách lên đến 100 km (hình 6.2).



Hình 6.2. Bụi không khí từ Mông Cổ phát tán trên biển Nhật Bản (trái). Người dân Malaysia và Singapore đang phải trải qua những ngày tồi tệ vì ô nhiễm không khí do khói bụi từ những đám cháy rừng Indonesia bay sang ngày 24/06/2013 (phải).

6.3.3. Lắng đọng

Lắng đọng là bước cuối cùng trong chu trình vi sinh vật trong không khí. Cơ chế quá trình lắng đọng: lắng đọng trọng lực; khuếch tán phân tử từ trên xuống; tiếp xúc bề mặt; lắng đọng nhờ mưa; lắng đọng tĩnh điện.

– *Lắng đọng trọng lực*: Cơ chế chính của lắng đọng trọng lực nhờ lực hút của Trái Đất lôi các sol khí sinh học trong không khí kéo chúng xuống đất và hạn chế sự phân tán theo không gian cũng như thời gian. Trong điều kiện không có sự di chuyển của không khí, lắng đọng trọng lực phụ thuộc vào lực hút, tỷ trọng và kích thước của hạt và độ nhớt không khí.

– *Khuếch tán phân tử từ trên xuống*: Quá trình diễn ra tự do do dòng không khí tự nhiên và lốc xoáy làm tăng chuyển động hướng xuống của các hạt bụi trong không khí. Sự di chuyển thường hướng xuống do trọng lực. Tốc độ lắng xuống do khuếch tán phân tử trong không khí tăng khi tốc độ gió và nhiễu động không khí tăng.

– *Tiếp xúc bề mặt*: là quá trình hạt bụi tiếp xúc bề mặt như lá, cây, bề mặt vật chất. Khi tiếp xúc bề mặt xảy ra thì làm mất động năng. Trong tự nhiên, rất khó để có bề mặt phẳng và

nhẫn để dòng không khí không bị cản trở. Vì vậy, tiếp xúc bề mặt là yếu tố ảnh hưởng đến sự phân bố và lắng đọng của bụi trong không khí, đặc biệt là các sol khí sinh học.

– *Lắng đọng nhò mưa*: xảy ra do phản ứng cô đặc giữa hạt mưa và sol khí sinh học tạo cho sol khí sinh học có khối lượng lớn hơn và lắng xuống nhanh hơn. Lắng đọng nhò mưa phụ thuộc vào lượng mưa. Với lượng mưa lớn thì tốc độ và số lượng các hạt cô đặc càng nhiều kéo theo càng nhiều sol khí sinh học lắng xuống.

– *Lắng đọng nhò tĩnh điện*: là do phản ứng cô đặc nhò vào lực hấp dẫn tĩnh điện giữa các hạt. Các hạt thường có xu hướng mang điện tích trái dấu. Vi sinh vật thường tích điện âm kết hợp với bề mặt trung tính pH. Những điện tích âm này có thể kết hợp với các hạt bụi mang điện tích dương tạo ra thể cô đặc tĩnh điện. Khi hiện tượng này xảy ra làm tăng khối lượng các sol khí sinh học và dẫn đến tăng sự lắng đọng.

6.4. VI SINH VẬT TỒN TẠI TRONG KHÔNG KHÍ

Không khí không phải là môi trường trú ngụ và phát triển của các vi sinh vật không có chất dinh dưỡng và vi sinh vật dễ bị mất nước. Vì vậy, thời gian tồn tại của chúng rất hạn chế. Tuy nhiên, vi sinh vật có những cơ chế đặc trưng giúp cho chúng kháng lại được các yếu tố bất lợi của môi trường và giữ được các đặc tính sinh học. Bào tử của vi khuẩn, nấm mốc và nấm, nang của động vật nguyên sinh có những cơ chế đặc biệt để sống sót trong môi trường không khí. Thời gian sống sót của những cấu trúc này trong không khí là vô hạn định. Thời gian sống sót của những vi sinh vật không có cấu trúc đặc trưng trong không khí được tính bằng giây.

Khả năng tồn tại của VSV trong không khí thường phụ thuộc vào môi trường, khoảng thời gian và loài vi sinh vật. Nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tồn tại của vi sinh vật như độ ẩm, nhiệt độ, tia bức xạ...

6.4.1. Độ ẩm tương đối

Độ ẩm tương đối của không khí là yếu tố quan trọng tác động đến sự tồn tại của vi sinh vật không khí.

Khi độ ẩm tương đối không khí tăng lên 100% thì tỷ lệ chết của *E. coli* tăng lên. Thông thường vi khuẩn Gram âm kết hợp với sol khí sinh học tồn tại ở mức không khí có độ ẩm tương đối thấp hoặc trung bình. Khi độ ẩm tương đối tăng lên trên 80% làm tăng tỷ lệ chết.

Vi khuẩn Gram (+) thì ngược lại, khi độ ẩm tương đối tăng thì thời gian tồn tại càng dài.

Virus cúm cũng có ảnh hưởng bất lợi khi độ ẩm tương đối tăng lên. Virus có vỏ bọc protein bên ngoài lớp nucleocapsid tồn tại lâu hơn trong không khí có độ ẩm tương đối dưới 50%. Trong khi đó virus không có vỏ bọc ổn định trong không khí có độ ẩm tương

đối lớn hơn 50%. Thường thì virus có vỏ bọc tồn tại tốt hơn virus không có vỏ bọc khi chúng được kết hợp với sol khí sinh học trong không khí.

6.4.2. Nhiệt độ

Nhiệt độ là yếu tố chính gây bất hoạt vi sinh vật không khí. Thông thường, nhiệt độ cao gây bất hoạt do kết hợp mất nước và làm biến tính protein. Nhiệt độ ôn hòa tăng thời gian tồn tại của vi sinh vật không khí. Nhiệt độ băng giá làm mất khả năng sống sót của một số vi sinh vật vì tạo lớp tinh thể bao quanh cơ thể. Tác động của nhiệt độ lên vi sinh vật thường kết hợp với các yếu tố môi trường khác như độ ẩm tương đối.

6.4.3. Tia bức xạ

Tia cực tím và bức xạ ion gây tổn hại đến vi khuẩn, virus, nấm và động vật nguyên sinh. Tác động của tia cực tím gây tổn hại đến thành phần nucleotide trong DNA. Bức xạ ion và tia X gây tổn hại DNA như bẻ gãy sợi đơn và sợi đôi DNA và làm thay đổi cấu trúc các base cấu tạo nên DNA. Cuối cùng gây úc chế các hoạt động sinh học như sao chép bộ gene, sao mã và dịch mã.

Vi sinh vật có nhiều cơ chế để chống lại tia bức xạ: kết hợp với các hạt bụi không khí lớn hơn, có chứa các sắc tố hay carotenoid, bao bọc bởi độ ẩm cao nhằm kháng lại các tia bức xạ. Một số vi sinh vật có khả năng sửa sai tổn hại DNA gây ra bởi tia bức xạ. Vi sinh vật đất *Dienococcus radiodurans* có chứa enzyme sửa sai DNA nhiễm sắc thể.

6.4.4. Oxy, các yếu tố kết hợp không khí (AOF) và ion

Oxy, các yếu tố kết hợp không khí (AOF) và ion là thành phần tạo nên không khí. Tác động kết hợp của ba thành phần này gây bất hoạt một số loài vi sinh vật trong không khí.

Độc tính của gốc chứa oxy trong oxy già, các gốc peroxide hay hydroxyl gây bất hoạt các vi sinh vật.

Các yếu tố kết hợp không khí (AOF): thường kết hợp với các gốc độc tính chứa oxy. Hỗn hợp các yếu tố này được tạo ra khi phản ứng xảy ra giữa ozone và hydrocarbon. Khi nồng độ của ozone và hydrocarbon tăng có thể ảnh hưởng đến enzyme và acid nucleic, cuối cùng tác động mạnh đến sự tồn tại của vi sinh vật.

Sự hình thành các ion, ví dụ như Cl^- , NO_3^- , hay S^{2-} , thường xảy ra trong tự nhiên dưới tác động của nhiều quá trình. Ánh sáng, phân ly nước và các tia bức xạ làm thay đổi điện tử của các phân tử khí tạo nên các anion và cation. Ion dương làm giảm hoạt động sinh lý của vi sinh vật như bất hoạt protein màng tế bào và có thể ảnh hưởng đến DNA.

6.5. VI SINH VẬT KHÔNG KHÍ NGOÀI TRỜI

6.5.1. Phát tán lên không khí của mầm bệnh vi sinh vật trong đất

Mầm bệnh vi sinh vật trong đất là những vi sinh vật có khả năng trao đổi chất, sinh trưởng và sinh sản trong đất, bao gồm vi sinh vật nhân sơ và nhân thật. Một số vi sinh vật tạo bào tử có thể phát tán lên không khí và gây bệnh cho người. *Bacillus anthracis* là vi khuẩn gây bệnh từ đất gây ra bệnh than ở người và động vật lây nhiễm qua đường hô hấp, tiêu hóa và qua da. Một số bào tử của vi sinh vật có thể tồn tại trong đất nhiều năm.

Một số mầm bệnh từ nấm có nguồn gốc từ đất, ví dụ *Coccidioides immitis* và *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* gây bệnh hô hấp cho người và động vật, sinh trưởng ở trong đất vùng khô hạn. *Histoplasma capsulatum* gây nhiễm trùng đường hô hấp.

6.5.2. Đại dịch cúm

Đại dịch cúm dùng để nói đến dịch bệnh do virus cúm thường xảy ra trên diện rộng khắp thế giới với tỷ lệ người nhiễm cao. Dịch cúm là bệnh truyền nhiễm từ chim hoặc thú gây ra bởi virus RNA của họ Orthomyxoviridae.

Bệnh cúm có nguồn gốc từ chim liên quan đến một nhóm lớn virus gây bệnh cúm trên chim gọi là “cúm gia cầm”, có loài chỉ gây bệnh cho gia cầm mà không gây bệnh cho người, có loài gây bệnh cho cả gia cầm và người. Đại dịch cúm xảy ra khi một chủng cúm trên chim lây nhiễm trên người và lan từ người này sang người khác.

Virus cúm lây truyền giữa người với người qua bốn cơ chế: tiếp xúc trực tiếp với người bệnh; tiếp xúc gián tiếp qua các vật dụng như quần áo, giường bệnh; qua đường hô hấp khi hít thở giọt chứa virus hoặc các sol khí sinh học chứa virus.

6.5.3. Vi sinh vật trong mây

Vi sinh vật có khả năng bị tác động của các quá trình khí tượng. Đặc biệt, một số vi sinh vật xúc tác sự hình thành đá và kết tủa trong mây. 95% nhân đá là các hạt sinh học và ít nhất 45% có nguồn gốc từ vi khuẩn.

Vi sinh vật hiện diện trong mây và sương mù. Số lượng vi khuẩn và nấm trong mây biến thiên theo mùa với số lượng nhiều nhất vào mùa hè và mùa thu.

Số lượng vi khuẩn trong mây chiếm từ 10^3 đến 10^4 CFU/ml, nấm từ 10^2 đến 10^4 CFU/ml.

6.5.4. Nông nghiệp

Rất nhiều mầm bệnh gây bệnh cho thực vật lây nhiễm qua vi sinh vật không khí. Các sol khí sinh học lây bệnh cho cây trồng và động vật gây thiệt hại kinh tế lớn. Lúa và lúa mì là hai cây lương thực chính có tầm quan trọng lớn trong an ninh lương thực thế giới. Nguồn gây bệnh chính cho loại cây này là nấm gây bệnh đóm lá lúa mì. Các bào tử nấm gây bệnh tàn phá lúa mì và các cây ngũ cốc khác.

Bào tử nấm gây bệnh đóm lá lúa mì có thể lan truyền đi hàng trăm đến hàng nghìn km qua không khí. Thực vật nhiễm bệnh tạo ra hàng nghìn bào tử và giải phóng ra không khí nhờ nhiễu động không khí tự nhiên hay qua quá trình thu hoạch màng. Các bào tử này được truyền đi trong không khí, bám và sinh trưởng trên những loài thực vật mẫn cảm với mầm bệnh. Thời gian để tạo nên bào tử mới chỉ cần vài tuần và bào tử mới lại được truyền đi trong không khí.

Mầm bệnh vi sinh vật lây truyền qua không khí gây ảnh hưởng lớn đến ngành chăn nuôi. Bệnh lở mồm long móng là ví dụ về mầm bệnh lây lan qua không khí được tạo bởi các sol khí sinh học. Các sol khí sinh học thường liên quan đến lây lan các mầm bệnh đường hô hấp, ví dụ *Salmonella typhimurium* giữa các con bò trong hai trang trại cách biệt nhau. *S. typhimurium* có thể sống sót trong không khí thời gian dài, sau đó lây nhiễm và gây bệnh viêm phổi ở bò, gà. Vì vậy, chu trình vi sinh vật không khí có thể đóng vai trò trong lây lan mầm bệnh này.

6.5.5. Nước thải

Có rất nhiều nguy cơ liên quan đến xử lý và xả thải nước thải. Xử lý nước thải tạo ra các sản phẩm phân bón gồm những chất hữu cơ giàu chất dinh dưỡng (biosolid). Nước thải mang các mầm bệnh vi khuẩn, virus, động vật nguyên sinh và giun sán. Dùng hệ thống dòng chảy nước thải và các sản phẩm từ nước thải hoặc sau khi xử lý nước thải tưới cho thực vật tiềm ẩn khả năng tạo các sol khí sinh học mang mầm bệnh.

Phương pháp thải các biosolid đầu tiên sau khi xử lý nước thải dùng làm phân bón cho nông nghiệp. Vấn đề quan tâm lớn nhất là nó liên quan đến tạo thành các sol khí sinh học có mang mầm bệnh. Những mầm bệnh này phát tán trong không khí và có nguy cơ gây ảnh hưởng cho người và động vật sống gần đó.

6.5.6. Các độc tố trong không khí

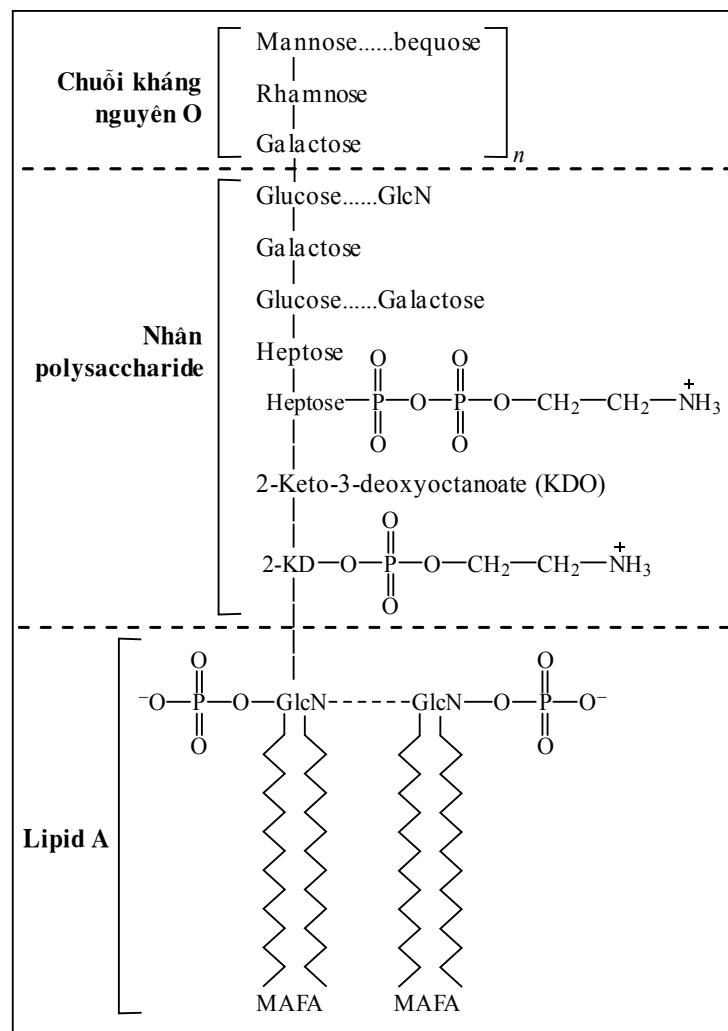
Một số độc tố có thể truyền đi trong không khí. Ví dụ độc tố A botulinum từ *Clostridium botulinum* có thể sử dụng để tạo vũ khí sinh học. Độc tố A botulinum là chất độc đối với hệ thần kinh thường liên quan đến tiêu thụ thức ăn nhiễm bệnh. Tuy nhiên, chỉ cần một liều lượng nhỏ ($0,3\text{ }\mu\text{g}$) được hít vào sẽ gây chết sau 12 giờ. Nguyên nhân chết là do ngạt khí vì chất độc làm bất hoạt cơ của hệ hô hấp.

Nội độc tố từ vi khuẩn *Staphylococcus* có thể gây chết người khi hít thở một lượng $25\text{ }\mu\text{g}$. Các triệu chứng bao gồm chuột rút, nôn và tiêu chảy thường xuất hiện sau khi hít các sol khí sinh học khoảng 1 giờ.

Độc tố từ vi sinh vật trong không khí là lipopolysaccharide (LPS) có nguồn gốc từ màng ngoài vi khuẩn Gram âm. Độc tố là tác nhân gây dị ứng mạnh khi kết hợp với hạt bụi không khí gây ra các triệu chứng hô hấp cấp tính như tức ngực, ho, thở dốc, sốt và khò khè.

LPS có ba thành phần chính: lớp lipid A có hai chuỗi đường cấu tạo bởi glucosamine phosphoryl hóa kết hợp với acid béo; lớp nhân polysaccharide và chuỗi kháng nguyên O thay đổi tùy loài vi khuẩn (hình 6.3). LPS được giải phóng khi vi khuẩn Gram âm bị phân giải hoặc khi chúng sinh trưởng.

Trong đất có khoảng 10^8 vi khuẩn/g đất có thể tạo thành sol khí sinh học và là nguồn tạo ra các nội độc tố.



Hình 6.3. Cấu trúc lipopolysaccharide (LPS).

6.6. VI SINH VẬT KHÔNG KHÍ TRONG NHÀ

Không khí trong nhà và nơi làm việc là môi trường lây nhiễm các vi sinh vật trong không khí, gây ra mối quan ngại cho sức khỏe con người. Môi trường không khí trong nhà thường hạn chế lưu thông và ít được tiếp xúc trực tiếp với các tia bức xạ như không khí ngoài trời. Nhiệt độ và độ ẩm trong nhà thường thích hợp cho các vi sinh vật tồn tại và phát triển.

Một số mầm bệnh thích nghi tồn tại và truyền nhiễm ở môi trường trong nhà. *Legionella pneumophila* gây bệnh viêm phổi Lê dương và sốt.

Không khí trong nhà lành mạnh hay dễ mắc bệnh phụ thuộc vào nhiều yếu tố: các thiết bị lọc không khí, hệ thống thông gió, sức khỏe và vệ sinh của các thành viên, hệ thống cửa chính và cửa sổ, ánh sáng, nhiệt độ và độ ẩm.

Bệnh viện là nơi tiềm ẩn các vi sinh vật gây bệnh có thể kết hợp với các sol khí sinh học.

Phòng thí nghiệm có các nghiên cứu về mầm bệnh phải đặt dưới điều kiện nghiêm ngặt. Các mầm bệnh có thể phát tán lên không khí và gây ra đại dịch. Năm 1988, tám người làm việc trong phòng thí nghiệm nghiên cứu về *Brucella* sp. ở Mỹ đã bị bệnh Brucella cấp tính. Nguyên nhân do rã đông và nuôi cấy *Brucella* sp. không đúng phòng nuôi cấy đúng quy định về an toàn. Các biện pháp để kiểm soát các sol khí sinh học rất quan trọng trong phòng thí nghiệm nghiên cứu về các mầm bệnh, bởi vì chúng rất dễ phát tán và gây ra dịch bệnh.

6.7. KIỂM SOÁT SOL KHÍ SINH HỌC

Có nhiều phương pháp để kiểm soát sol khí sinh học. Chúng ta có thể kiểm soát các giai đoạn của chu trình vi sinh vật không khí: thải các sol khí sinh học vào trong không khí; phát tán và lắng đọng. Các phương pháp bao gồm: thông gió, lọc khí, xử lý tia cực tím, chất diệt khuẩn và cách ly vật lý.

6.7.1. Thông gió

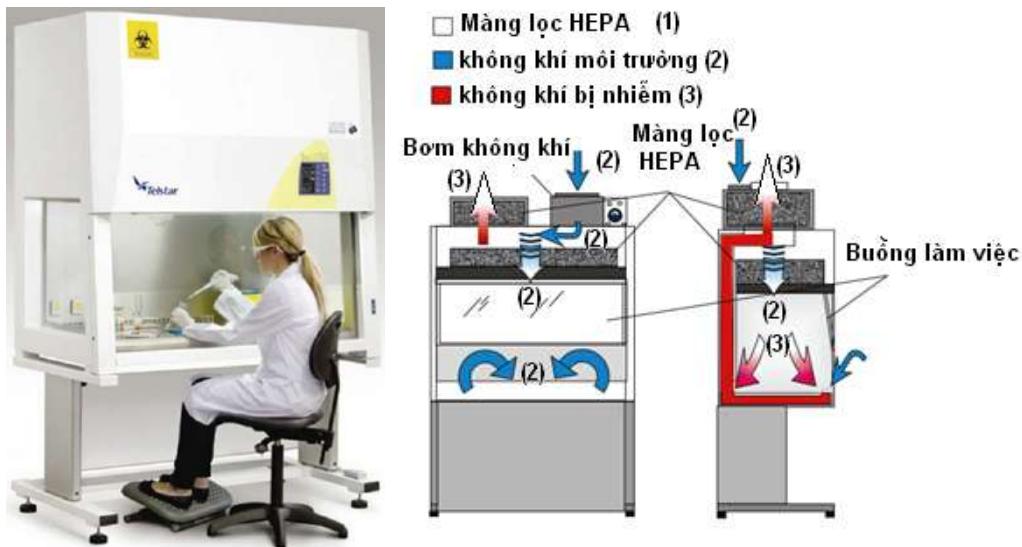
Thông gió là phương pháp thường được sử dụng để chống lại sự tập trung của các hạt trong không khí. Cơ chế của phương pháp này là tạo ra dòng không khí chuyển động qua các vùng không khí bị nhiễm. Cách đơn giản nhất là mở cửa sổ hoặc bật điều hòa để không khí bên ngoài lưu chuyển vào bên trong nhà.

Thông khí là phương pháp kém hữu hiệu để kiểm soát các mầm bệnh trong không khí nhưng nó rất quan trọng. Phương pháp này dựa trên quá trình trộn lẫn giữa không khí trong nhà và ngoài trời. Vì vậy, ở các tòa nhà công cộng, nhất là bệnh viện, cần thực hiện các phương pháp hữu hiệu hơn để kiểm soát sol khí sinh học.

6.7.2. Lọc khí

Lọc khí là phương pháp đơn giản và hữu hiệu, sử dụng hệ thống lọc cho không khí lưu thông một chiều để loại bỏ các hạt nhiễm trong không khí.

Trong các tủ cấy vô trùng, màng lọc các hạt không khí hiệu suất cao (HEPA) thường được sử dụng (xem ảnh màu và chú thích hình 6.4 trang 362).



Hình 6.3. Tủ cấy vô trùng (trái) và dòng không khí trong tủ cấy vô trùng mặt cắt trước và bên (phải).

Dòng không khí chưa được lọc (2) khi được bơm không khí vào và qua màng lọc HEPA thành không khí sạch trước khi được thổi vào trong buồng làm việc tránh cho mẫu bị nhiễm bởi không khí bên ngoài. Không khí sạch ở trong buồng làm việc bị nhiễm (3) từ mẫu vật sẽ được thổi qua màng lọc trước khi thải ra ngoài MT.

Các lỗ trên màng lọc có kích thước rất nhỏ để loại bỏ các hạt bị nhiễm trong không khí, nhưng do giá thành rất cao nên không được sử dụng trong các tòa nhà.

Trong các tòa nhà, hệ thống lọc khí dạng túi (baghouse: cơ chế hoạt động như máy hút bụi) thường được sử dụng.

Hiệu suất lọc khí thường được biểu thị bằng phần trăm các hạt bụi được lọc, phần trăm càng cao thì khả năng lọc càng hiệu quả. Hệ thống lọc trong các tòa nhà có chỉ số này từ 30 – 50% với các lỗ trên màng lọc từ 1 – 5 µm. Để lọc được virus cần chỉ số 97%.

Trong nuôi cấy vi sinh vật, bông được dùng có tác dụng giữ VSV với bụi bẩn trong không khí. Ví dụ làm nút bông các ống môi trường.

6.7.3. Khử trùng không khí bằng các phương pháp vật lý hoặc hóa chất

Xử lý bằng các chất diệt khuẩn để trừ các vi sinh vật trong không khí để chắc chắn chúng không thể tồn tại và gây nhiễm.

Có nhiều cách để trừ các vi sinh vật trong không khí như gia nhiệt, các hóa chất siêu khử nước, dùng ozone hay tia cực tím. Xông hơi bằng acid lactic, hơi formaldehyde pha trong thuốc tím... Dùng phương pháp nung nóng cục bộ bằng đèn còn như trong cấy truyền VSV, hấp khử trùng bằng nhiệt theo phương pháp Tyldan hay phương pháp Pasteur...

Tia cực tím thường được sử dụng để kiểm soát nhiều loại mầm bệnh. Cơ bản, tia cực tím có thể tiêu diệt gần hết các mầm bệnh gây nhiễm trong không khí, nó chỉ phụ thuộc vào thời gian và cường độ sử dụng.

Nhiều yếu tố như độ ẩm tương đối, nhiệt độ, ozone và tia cực tím có thể được sử dụng để kiểm soát không khí bị nhiễm mầm bệnh.

6.7.4. Cách ly

Cách ly là phương pháp đóng gói tránh tác động của môi trường bên ngoài bằng cách sử dụng áp suất không khí âm hoặc dương và vòng đệm kín.

Áp suất không khí âm tồn tại khi dòng không khí được tích lũy và đưa vào vùng cách ly. Phương pháp này được sử dụng trong bệnh viện để bảo vệ mọi người ở bên ngoài tránh khỏi mầm bệnh từ bệnh nhân trong khu vực cách ly. Không khí trong phòng được thải ra bầu khí quyển sau khi đi qua màng lọc và xử lý hóa chất.

Áp suất không khí dương có nguyên lý ngược lại, không khí được hút ra ngoài khu vực cách ly vì vậy bảo vệ những người phía trong khu vực khỏi mầm bệnh từ bên ngoài. Không khí bên ngoài được lọc qua hệ thống lọc và tạo ra không khí sạch các tác nhân gây bệnh trước khi đưa vào bên trong khu vực cách ly.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Không khí không phải là môi trường thuận lợi cho vi sinh vật phát triển. Tuy nhiên, trong không khí vẫn có vi sinh vật do cuốn theo bụi đất và sự hô hấp cũng như bài tiết của người và động vật.

Đa số vi sinh vật trong không khí là loại hoại sinh như cầu khuẩn, trực khuẩn có bào tử, bào tử nấm mốc, nấm men. Nhiều khi trong không khí cũng có vi sinh vật gây bệnh như trực khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*), trực khuẩn bạch hầu (*Corynebacterium diphtheriae*), liên cầu tan máu, tụ cầu gây bệnh, trực khuẩn ho gà, virus cúm, sởi, quai bị... từ bệnh nhân hay người lành mang mầm bệnh tiết ra.

Mặc dù rằng vi sinh vật trong không khí không nhiều lăm, không sinh sản và phát triển, nhưng cũng cần hết sức chú ý, vì không khí là phương tiện truyền vi sinh vật từ chỗ này sang chỗ khác. Không khí cũng là nguồn nhiễm bẩn thực phẩm và gây nên một số bệnh truyền nhiễm.

Trong không khí, các sol khí sinh học mang các độc tố, các phần của tế bào hoặc các mầm bệnh gồm virus hoặc vi khuẩn.

Chu trình vi sinh vật không khí gồm ba quá trình: thải các sol khí vào trong không khí, phát tán và lắng đọng.

Không khí không phải là môi trường trú ngụ và phát triển của các vi sinh vật không có chất dinh dưỡng và vi sinh vật dễ bị mất nước. Các yếu tố độ ẩm tương đối, nhiệt độ, tia bức xạ, oxy, các yếu tố kết hợp không khí và ion tác động đến sự tồn tại và phân bố của vi sinh vật trong không khí.

Có nhiều phương pháp để kiểm soát sol khí sinh học: thông gió, lọc khí, xử lý tia cực tím, chất diệt khuẩn và cách ly vật lý.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. So sánh sol khí và sol khí sinh học?
2. Nêu chu trình của vi sinh vật không khí? Các biện pháp kiểm soát dựa trên chu trình của chúng?
3. Các nhân tố môi trường ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật không khí?
4. Các phương pháp kiểm soát sol khí sinh học?

* Chọn đáp án đúng nhất

5. Sự phân bố của vi sinh vật trong môi trường không khí phụ thuộc vào:

- | | |
|----------------------------------|------------------|
| a. Khí hậu trong năm. | b. Vùng địa lý. |
| c. Hoạt động sống của con người. | d. Cá ba ý trên. |

6. Phương pháp thông dụng để xác định số lượng VSV trong không khì là:

- | | |
|--|--|
| a. Đếm khuẩn lạc hình thành (CFU) trong 1 m ³ không khì: (CFU/m ³). | b. Đếm số khuẩn lạc hình thành (Colony forming unit – CFU) trên các đĩa. |
| c. Khảo sát thành phần hóa học của các tế bào vi khuẩn trong 1 m ³ không khì. | d. Đếm vi sinh vật dưới kính hiển vi. |

7. Biện pháp làm sạch không khì:

- | | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| a. Phương pháp lọc. | b. Khử trùng bằng tác nhân vật lý. |
| c. Khử trùng bằng hóa chất. | d. Tất cả phương pháp trên. |

* Dièn vào các chỗ trống:

8. Vi sinh vật được tung vào không khì chủ yếu là do.....(a),..... hay.....(b)..... của người và súc vật mang mầm bệnh.

9. Sol khí – hay là aerosol – là hệ keo của các hạt chất rắn....(a)..... hoặc.....(b)..... khác. Sol khí gây nguy hiểm cho sức khỏe con người do....(c)qua đường hô hấp và tích tụ trong đường mũi hoặc cuống phổi.

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. **Dienococcus radiodurans:** Vi khuẩn có khả năng tồn tại trong các loại môi trường cực trị và có khả năng khôi phục bộ gene bị nứt nhờ enzyme sửa sai DNA.
2. **Legionella pneumophila:** Vi khuẩn Gram (-), hiếu khí, có roi, gây bệnh viêm phổi Lê dương và sốt.
3. **Lipopolysaccharide (LPS):** có nguồn gốc từ màng ngoài vi khuẩn Gram (-) và có ba thành phần chính: lớp lipid A có hai chuỗi đường cấu tạo bởi glucosamine phosphoryl hóa kết hợp với acid béo; lớp nhân polysaccharide và chuỗi kháng nguyên O.
4. **Sol khí hay là aerosol:** Hệ keo của các hạt chất rắn hoặc các giọt chất lỏng lơ lửng trong không khì hoặc chất khí khác.
5. **Sol khí sinh học:** Sol khí kết hợp với các độc tố, các phần của tế bào hoặc các mầm bệnh gây bệnh cho người bao gồm virus hoặc vi khuẩn.

Chương 7

VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG NƯỚC

Mục tiêu

- Hiểu được sự phân bố của vi sinh vật phù hợp với điều kiện lý hóa của môi trường nước.
- Phân biệt các kiểu dinh dưỡng của vi sinh vật trong môi trường nước.
- Nắm được vai trò của vi sinh vật đại dương, biển, sông, hồ, ao...
- Hiểu được các biện pháp kiểm soát vi sinh vật môi trường nước.

7.1. SINH CẢNH VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC

Tất cả những nơi có chứa nước trên bề mặt hay dưới lòng đất đều được coi là môi trường nước. Ví dụ như ao, hồ, sông, biển, nước ngầm... Những địa điểm chứa nước đó còn gọi là các thủy vực. Trong các thủy vực khác nhau, tính chất hóa học và vật lý rất khác nhau. Bởi vậy môi trường sống ở từng thủy vực đều có đặc trưng riêng biệt và sự phân bố của vi sinh vật phụ thuộc vào những đặc trưng riêng biệt đó.

– Nước ngầm có trong những lớp đất nằm dưới mặt đất do các nguồn nước khác thâm vào. Nước ngầm có hàm lượng muối khoáng khác nhau tùy từng vùng, có vùng chứa nhiều CaCO_3 gọi là nước cứng, có vùng chứa ít CaCO_3 gọi là nước mềm. Nói chung nước ngầm rất nghèo chất dinh dưỡng do đã được lọc qua các tầng đất.

– Nước bề mặt bao gồm suối, sông, hồ, biển. Suối được tạo thành ở những nơi nước ngầm chảy ra bề mặt đất hoặc từ khe của các núi đá. Tùy theo vùng địa lý nước suối có thể rất khác nhau về nhiệt độ và thành phần hóa học. Có những suối nước nóng chảy ra từ các vùng núi lửa hoặc từ độ sâu lớn. Có những suối có thành phần chất khoáng điển hình có tác dụng chữa bệnh. Tùy theo thành phần và hàm lượng chất khoáng mà người ta phân biệt suối mặn, suối chua, suối sắt, suối lưu huỳnh... Sông có lượng nước nhiều hơn suối. Tính chất lý học và hóa học của sông cũng khác nhau tùy thuộc vào vùng địa lý. Sông ở vùng đồng bằng thường giàu chất dinh dưỡng hơn vùng núi nhưng lại bị ô nhiễm hơn do chất thải công nghiệp và sinh hoạt.

Hồ là những vùng trũng ngập đầy nước trong đất liền. Tính chất lý học và hóa học của các loại hồ cũng rất khác nhau. Hồ ở các vùng núi đá có nguồn nước ngầm chảy ra và hồ ở vùng đồng bằng khác nhau rất lớn về nhiệt độ cũng như thành phần chất dinh dưỡng. Ngay ở trong một hồ cũng có sự phân tầng, ở mỗi tầng lại có một điều kiện môi trường

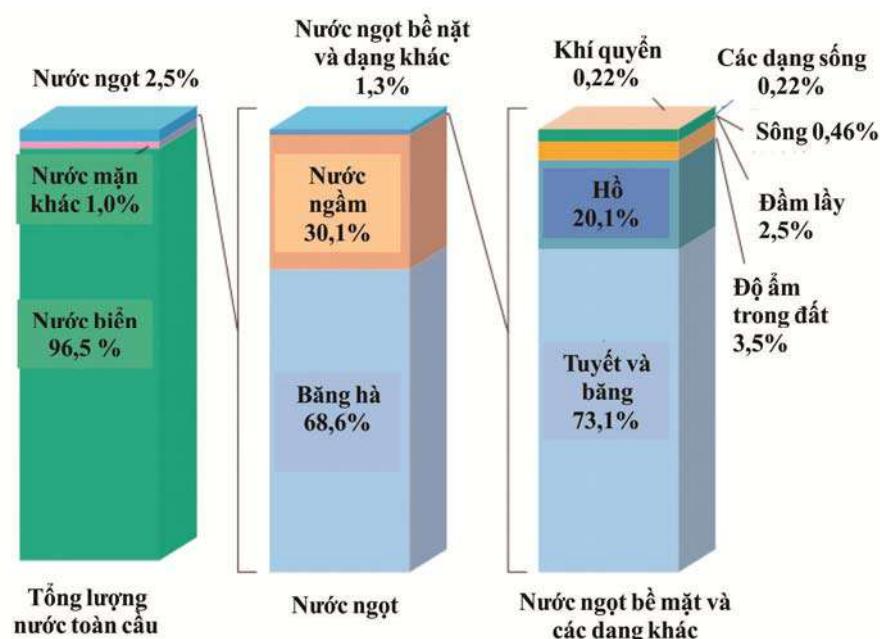
khác nhau. Có những hồ có nồng độ muối cao gọi là hồ nước mặn, nồng độ muối có thể lên tới 28%.

Biển bao phủ gần 3/4 bề mặt Trái Đất, khác với các thủy vực trong đất liền điển hình về hàm lượng muối cao tới 35%. Ngoài ra, biển còn có thành phần các chất khoáng khác với các thủy vực trong đất liền. Các vùng biển và các tầng của biển cũng có các đặc trưng môi trường khác nhau. Ví dụ như về nhiệt độ, áp lực thủy tĩnh, ánh sáng, pH, thành phần hóa học... Tất cả những yếu tố khác nhau đó đều ảnh hưởng trực tiếp đến sự phân bố của vi sinh vật trong các môi trường nước.

7.1.1. Các đặc điểm lý hóa

Căn cứ vào độ mặn, nước được chia thành nước ngọt (0,5%), nước mặn (33 – 37%) và nước quá mặn (290%) như biển Chết (hình 7.1).

Nước bề mặt được sưởi ấm nhờ ánh sáng mặt trời. Sự thay đổi nhiệt độ đột ngột của nước thường xảy ra khi nhiệt độ bề mặt thay đổi.



Hình 7.1. Phân bố của nước trên Trái Đất.
(Nguồn: <https://water.usgs.gov/edu/earthwherewater.html>.)

Nước bề mặt có nồng độ oxy hòa tan cao do không khí được khuếch tán và trộn lẫn trực tiếp vào nước. Vi sinh vật sản xuất tập trung nhiều ở tầng nước này vì dễ dàng tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời.

Tầng mặt có độ dày vài cm đến vài m, nơi đây có các đặc trưng riêng về hóa học cũng như các hoạt động sinh học diễn ra rất mạnh.

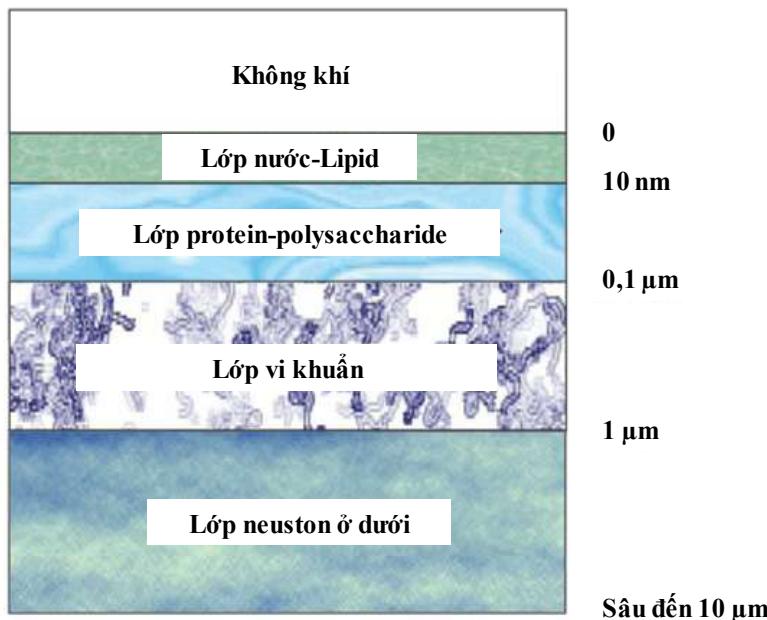
Thực tế, hệ thống nước luôn chuyển động theo không gian và thời gian. Sự phân tầng của nước bị trộn lẫn bởi hoạt động của gió, dòng chảy, thủy triều, các chất ở đáy nổi lên bề mặt, nhiệt độ và sự thay đổi độ mặn. Sự trộn lẫn mang oxy và chất dinh dưỡng đến những vùng nước nghèo chất dinh dưỡng.

Nhiệt độ của nước thay đổi theo mùa: nước bề mặt ấm vào mùa hè và lạnh vào mùa thu và mùa đông.

Ánh sáng có vai trò quan trọng tạo ra các sinh cảnh khác nhau trong môi trường nước. Ánh sáng có khả năng xuyên qua nước có độ sâu 200 m hoặc sâu hơn, tùy thuộc độ đục của nước. Vùng mà ánh sáng có thể xuyên qua gọi là vùng có ánh sáng. Ở hồ hoặc vùng bờ biển có vật chất trộn lẫn trong nước cao, vùng có ánh sáng dưới 1 m. Vùng mà ánh sáng không thể chiếu đến được gọi là vùng tối.

Lối sống, độ đa dạng và hoạt động của vi sinh vật phụ thuộc vào sự hiện diện của ánh sáng.

Cấu trúc nước còn được chia thành các sinh cảnh dựa vào độ sâu từ bề mặt xuống. Lớp màng nước trên bề mặt tiếp xúc với không khí được gọi là tầng vi sinh vật bề mặt – Neuston. Sinh cảnh Neuston chứa nồng độ cao các hợp chất hóa sinh, dinh dưỡng và tia cực tím ở mức độ cao. Neuston có cấu tạo bởi thể keo của các phân tử sinh học như lipid, protein và polysaccharide (hình 7.2).



Hình 7.2. Cấu tạo lớp neuston (Pepper et al., 2015).

Nước biển được chia thành bốn vùng: vùng nước tầng mặt, vùng nước tầng sâu trung bình, vùng nước biển sâu và vùng nước tầng sát đáy biển. Độ sâu nhất của biển là 11 km.

Nước ở hồ được chia thành hai vùng: vùng nước ngọt bề mặt và vùng sâu.

Trong sinh cảnh ở nước, vi sinh vật thường kết hợp với đại sinh vật. Mỗi quan hệ này được chia thành hai sinh cảnh: ngoại sinh (epibiotic) là sống bám bên ngoài bề mặt của sinh vật khác và nội sinh (endobiotic) là sống ký sinh bên trong một sinh vật khác.

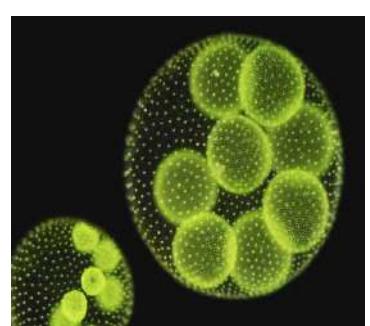
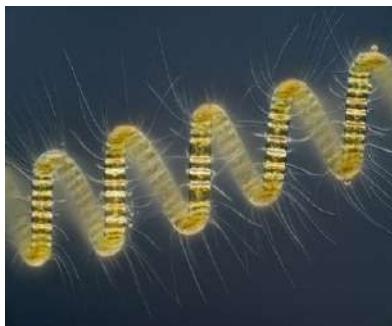
7.1.2. Vi sinh vật phù du

Sinh vật phù du (*plankto*: tiếng Hy Lạp nghĩa là lang thang hay phù du) là những sinh vật huyền phù trong môi trường nước và trôi theo dòng chảy, rất ít hoặc không thể kiểm soát được vị trí theo phương ngang của chúng.

Có ba nhóm chức năng sinh vật phù du:

- + Thực vật phù du: bao gồm cả vi khuẩn lam và tảo;
- + Vi khuẩn phù du: bao gồm vi khuẩn và vi khuẩn cỏ;
- + Động vật phù du: sinh vật phù du dị dưỡng, bao gồm: động vật nguyên sinh, động vật thuộc bộ chân chèo (copepod).

Thực vật phù du: là sinh vật sản xuất, sử dụng quá trình quang hợp để cố định CO₂ tạo ra các hợp chất hữu cơ. Đây là nguồn hợp chất carbon và năng lượng chính, nó được chuyển đến các sinh vật tiêu thụ khác trong lưới thức ăn.



Chaetoceros debilis (tảo cát)

Oocystis sp.

Volvox sp.



Ceratium sp.

Calanoida sp.

Hyperia macrocephala

Hình 7.3. Sinh vật phù du (xem hình màu trang 362).

7.1.3. Vi sinh vật tầng đáy

Tầng đáy (trầm tích) là vùng chuyển tiếp giữa nước và bì mặt khoáng. Ở tầng này các hợp chất hữu cơ từ tầng trên lắng xuống nằm gần sát môi trường đất.

Tại bì mặt tầng đáy, dinh dưỡng và nguồn carbon dồi dào nên số lượng vi sinh vật rất nhiều và hoạt động mạnh hơn sinh vật phù du. Vì các hoạt động xảy ra mạnh nên lượng oxy thường được sử dụng rất nhanh, do đó oxy thường được thay thế bởi các nguyên tố nhận điện tử khác như sulfate, nitrate hoặc sắt.

Sinh vật tầng đáy tạo ra đa dạng quần xã ở môi trường nước. Ở tầng mặt, vi sinh vật tự dưỡng chiếm ưu thế về số lượng và số loài. Ở tầng đáy thiếu ánh sáng, các sinh vật dị dưỡng và/hoặc hóa tự dưỡng chiếm ưu thế. Chu trình các chất dinh dưỡng như carbon, nito và lưu huỳnh phụ thuộc vào các hợp chất được kết hợp chuyển hóa hiếu khí và ky khí.

Chuyển hóa carbon

Các hợp chất hữu cơ được phân hủy hiếu khí để tạo ra các hợp hữu cơ nhỏ hơn và CO₂, phân hủy ky khí quá trình lên men tạo ra acid hữu cơ và CO₂. Acid hữu cơ đóng vai trò chất cho điện tử cho các vi khuẩn ky khí sử dụng, CO₂ là chất nhận điện tử trong hô hấp ky khí tạo ra CH₄. Vi khuẩn oxy hóa methane và các hợp chất chứa một carbon tạo năng lượng và thải CO₂. Oxy hóa methane ky khí thường xảy ở vi khuẩn cỏ.

Chuyển hóa nito

Phân hủy các chất cặn hữu cơ ở tầng đáy thường tạo ra NH₃. Các vi sinh vật tầng đáy thường sử dụng NH₃ cho hai mục đích:

- Sinh khói: NH₃ được đồng hóa như là nguồn nito cho các sinh vật phù du và vi sinh vật tầng đáy.
- Năng lượng: NH₃ được oxy hóa như là nguồn năng lượng cho các vi sinh vật hóa tự dưỡng.

7.2. CÁC KIỀU DINH DƯỠNG CỦA VI SINH VẬT TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC

7.2.1. Sinh vật sản xuất

Sinh vật sản xuất trong đại dương khoảng 50 – 60 petagram (1 Pg = 10¹⁵ g) và trong môi trường nước ngọt từ 1 đến vài Pg, chiếm 50% sinh khối toàn cầu. Khối lượng của vi sinh vật sản xuất trong nước phụ thuộc nhiều vào sự biến động của các yếu tố môi trường. Các yếu tố bao gồm: sự tồn tại của các chất vô cơ, đặc biệt là N và S; nhiệt độ nước, độ đục của nước liên quan đến ánh sáng truyền trong nước, mức độ trộn lẫn của các tầng nước từ trên xuống. Nồng độ của vi sinh vật sản xuất trong nước từ 10⁰ vi sinh vật/ml ở tầng đáy đến 10⁸ vi sinh vật/ml ở tầng mặt.

Ở biển có dòng hải lưu hoạt động mạnh thường có vi sinh vật sản xuất thấp bởi vì nồng độ các chất vô cơ thấp, đặc biệt là N và S. Ngoại lệ những vùng biển có dòng hải lưu cuộn từ tầng đáy di chuyển lên tầng mặt mang theo các hợp chất vô cơ từ tầng đáy lên.

Vùng biển duyên hải có vi sinh vật sản xuất cao vì dòng chảy các chất vô cơ từ sông ra biển, cũng như từ bờ mặt đất chảy xuống biển.

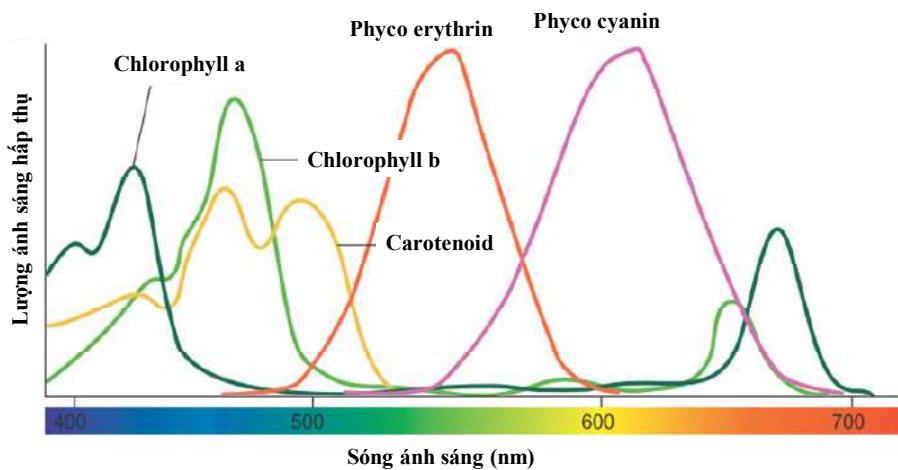
Ở những vùng nước ngọt nhỏ và cạn có chất dinh dưỡng dồi dào hoặc trung tính thường có sản lượng vi sinh vật sản xuất cao. Ngược lại, nước ngọt ở hồ rộng và sâu có chất dinh dưỡng thấp nên sản lượng vi sinh vật sản xuất thấp.

Các hoạt động của con người góp phần làm tăng nguồn dinh dưỡng cho môi trường nước như dòng nước chảy từ khu vực sản xuất nông nghiệp và các nguồn phân bón cho cây trồng.

Quang dưỡng: là các VSV sử dụng năng lượng từ ánh sáng. Chúng là các vi sinh vật sản xuất trong nước được chú ý và định lượng nhờ nguồn ánh sáng mặt trời trong nước. Quang dưỡng sử dụng các sắc tố hấp thụ quang phổ như các chlorophyll (hình 7.4).

Hóa dưỡng: khả năng cố định C sử dụng năng lượng từ các liên kết hóa học. Hóa dưỡng xảy ra ở tất cả các tầng nước, đặc biệt nhiều ở vùng có lượng oxy ít ở tầng đáy.

Vi khuẩn cổ có hình thức hóa dưỡng cố định NH_3 . *Crenarchaeota* chiếm 35 – 40% vi sinh vật ở vùng ngoài khơi có độ sâu dưới 1000 m. Với các nghiên cứu về gene và hệ gene đã chỉ ra rằng, hóa dưỡng bằng cách sử dụng oxy hóa NH_3 hiệu khí chiếm ưu thế.



Hình 7.4. Sự hấp thụ quang phổ các sắc tố của tế bào (Nguồn: NASA).

7.2.2. Sinh vật tiêu thụ

Với cách chung nhất, vi khuẩn phù du và động vật phù du tiêu thụ thực vật phù du và chúng lại được các sinh vật lớn hơn tiêu thụ trong chu trình chuyển hóa vật chất và năng lượng trong lối ăn.

Lối ăn thực tế của sinh vật ở môi trường nước rất phức tạp, các sinh vật dị dưỡng (vi khuẩn phù du và động vật phù du) tiêu thụ lẫn nhau. Các động vật phù du bị cá và các động vật khác tiêu thụ. Ở biển, lối ăn thường có 5 mắt xích để tạo ra những con cá lớn. Ở các vùng duyên hải, lối ăn thường có từ 1,5 đến 3,5 mắt xích.

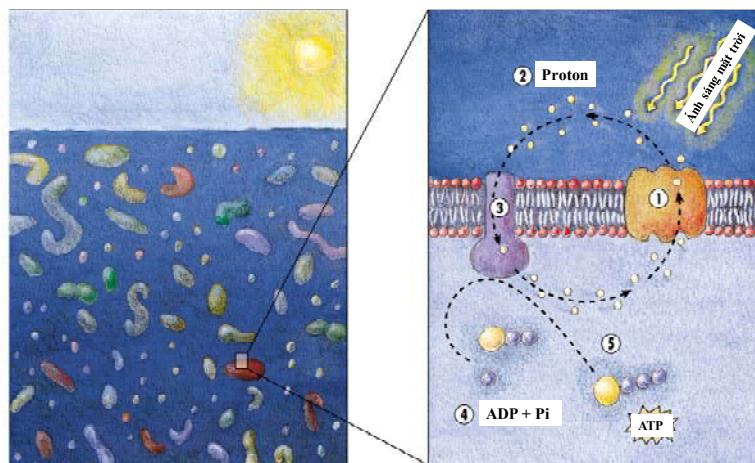
7.2.3. Quang dị dưỡng (Photoheterotrophy)

Quang dị dưỡng là hình thức dinh dưỡng cần có ánh sáng để cung cấp năng lượng. Quang dị dưỡng không diễn ra quá trình quang hợp bởi vì không liên quan đến quá trình cố định C. Có hai đặc điểm chính của sinh vật quang dị dưỡng.

– Quang dị dưỡng hiếu khí không có oxy (aerobic anoxyic phototrophy: AanP): sử dụng các sắc tố chlorophyll vi khuẩn (gọi là khuẩn diệp lục) để thu nhận năng lượng ánh sáng mặt trời vì chất cho điện tử không phải là nước nên không tạo ra oxy. Hình thức này xảy ra với nhiều loài vi sinh vật biển. Tế bào vi sinh vật tầng mặt mang gene AanP chiếm từ < 1% đến 10% quần xã.

– Phân tử sắc tố thu nhận ánh sáng ở dạng đơn giản được gọi là rhodopsin. Ở Proteobacteria, phân tử sắc tố protein rhodopin đóng vai trò như bơm proton hoạt hóa ánh sáng để tạo ra ATP (hình 7.5, xem ảnh màu trang 363). Gene mã hóa protein rhodopin được tìm thấy trong 13 – 80% vi khuẩn và vi khuẩn cổ ở biển.

Quang dị dưỡng mới được phát hiện gần đây và còn nhiều vấn đề chúng ta chưa có những hiểu biết sâu.



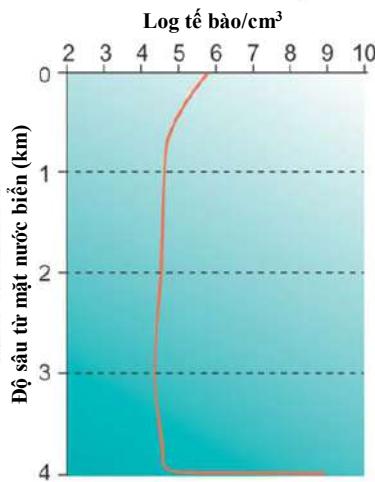
Hình 7.5. Cấu trúc protein rhodopsin ở màng tế bào (Delong et al., 2010).

Vi khuẩn phù du (trái) và cấu trúc protein rhodopsin (phải). (1) Protein rhodopsin sử dụng ánh sáng mặt trời để chuyển proton xuyên qua màng tế bào; (2) Proton ngoài tế bào; (3) Enzyme ATPase chuyển proton sử dụng lực vận chuyển proton để tổng hợp ATP (5) từ ADP + Pi (4).

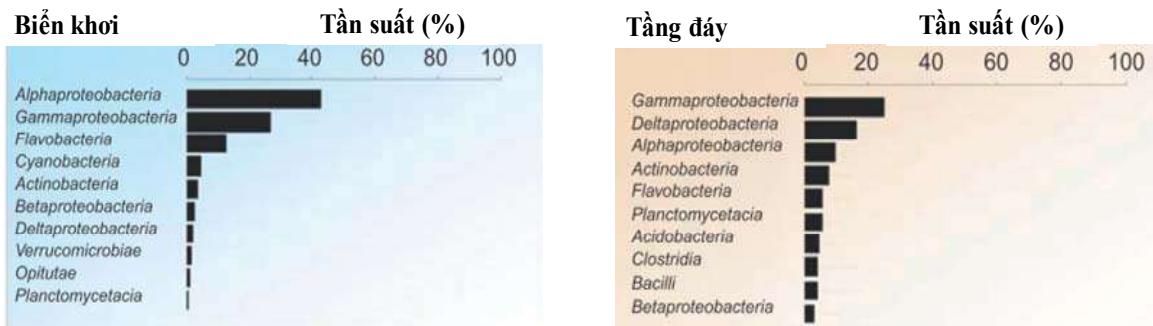
7.3. MÔI TRƯỜNG BIỂN

7.3.1. Quần xã sinh vật phù du ở đại dương

Đại dương có sinh cảnh đa dạng cả về cột nước từ trên xuống cũng như theo chiều ngang từ bờ ra đến ngoài khơi. Theo quy luật chung, mật độ vi sinh vật tập trung nhiều ở tầng nước mặt với 10^8 vi sinh vật/ml, giảm dần theo độ sâu với 10^7 vi sinh vật/ml ở 100 m sâu tính từ mặt nước biển (hình 7.6).



Hình 7.6. Mật độ tế bào theo cột nước và bề mặt trầm tích tại trạm Biotrans ở biển Đông – Bắc Atlantic (Jorgencen et al., 2007).



Hình 7.7. Phân bố quần xã vi khuẩn trong sinh cảnh biển khơi và tầng đáy (Zinger et al., 2011).

Mật độ vi sinh vật ở vùng duyên hải cao gấp 10 lần ở vùng biển khơi, vì ở đây có nguồn dinh dưỡng từ bờ tràn xuống biển.

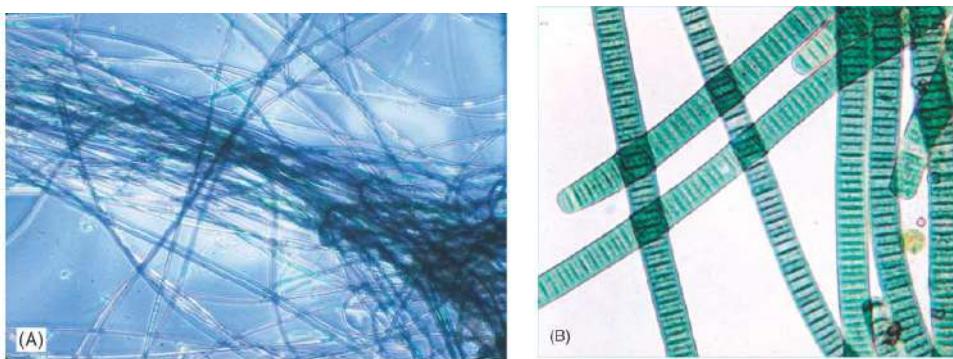
Theo thống kê quốc tế về vi sinh vật biển (IcoMM), các quần xã chiếm ưu thế ở tầng mặt biển khơi là vi khuẩn lam – *Cyanobacteria*. *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* có mặt ở tầng đáy (hình 7.7).

Theo thống kê quốc tế về vi sinh vật biển (IcoMM), có 10 lớp vi khuẩn có tần suất xuất hiện nhiều nhất.

* Thực vật phù du

Thực vật phù du ở biển tạo ra 50% oxy cho chúng ta. Trong đó tỷ lệ đóng góp của vi khuẩn lam (hình 7.8) và tảo là 50 : 50.

Vi khuẩn lam *Prochlorococcus* và *Synechococcus* chiếm ưu thế tạo ra 1/4 sản lượng của sinh vật sản xuất. *Synechococcus* tập trung ở nhiều ở vùng duyên hải, trong khi *Prochlorococcus* tập trung ở những khu vực rộng lớn có ít chất dinh dưỡng ở trung tâm biển cả. *Prochlorococcus* được phát hiện năm 1988 và là loài quang dưỡng có số lượng chiếm ưu thế trên hành tinh.



Hình 7.8. Vi khuẩn lam Lyngbya (A) và Oscillatoria (B).

Vi khuẩn lam có khả năng cố định N bao gồm: *Trichodesmium*, *Crocospaera* và *Anabaena*. *Trichodesmium* cố định một nửa lượng N ở biển cả. Các loài vi khuẩn lam cố định N có vai trò chính thực hiện việc cố định N ở môi trường biển.

Các loài thực vật phù du nhân thật tạo ra một nửa sinh khối sinh vật sản xuất ở biển và chiếm 1/4 toàn hành tinh. Các loài này tạo ra chu kỳ phát quang thường thấy ở bờ biển vào buổi tối. Có ba nhóm chính: tảo cát (Diatom); tảo cầu đá (*Coccolithophore*) và trùng tảo (*Dinoflagellate*).

+ Tảo cát: đóng góp 20% sản lượng quang hợp toàn cầu. Chúng còn tham gia tuần hoàn silica (SiO_2) ở biển, silica chiếm 4 – 50% vật chất khô của tế bào. Chúng có cấu tạo đơn bào hoặc tạo thành một chuỗi dài các tế bào tùy thuộc vào loài và điều kiện sống.

+ Tảo cầu đá: là nhóm chính thứ hai của thực vật phù du. Cơ thể được bao bọc bởi màng CaCO_3 nên có tên “đá”. Chúng là sinh vật sản xuất có kích thước nhỏ nhưng đóng góp 5% sản lượng sinh vật sản xuất toàn cầu.

+ Trùng tảo: bao gồm cả các loài không có khả năng quang hợp (sống dị dưỡng) và loài sống cộng sinh như san hô. Hiện tượng phát sáng về đêm có chu kỳ ở biển do trùng tảo gây ra.

Thành phần loài và số lượng thực vật phù du phụ thuộc vào điều kiện và theo mùa. Hiện tượng tảo nở hoa xảy ra khi nước thiếu oxy, ẩm và tĩnh tạo điều kiện cho một số loài tảo và vi khuẩn lam sinh sôi nhanh tạo thành tảo nở hoa. Hiện tượng tảo nở hoa theo chu kỳ tự nhiên hàng năm của hệ sinh thái biển và hồ. Tuy nhiên, thiếu oxy trầm trọng và tảo nở hoa ảnh hưởng đến chất lượng nước. Thủy triều đỏ ở vùng duyên hải có chứa một số loài tảo tạo ra độc tố tiềm ẩn, phần lớn từ sắc tố của trùng tảo. Độc tố này có thể gây bệnh ở người, độc với cá, gây chết chim và động vật khi ăn phải. Biển đổi khí hậu toàn cầu gây nên thiếu oxy trong nước và tạo điều kiện cho tảo nở hoa, thủy triều đỏ.

* Vi sinh vật dị dưỡng

Có nhiều loài vi sinh vật dị dưỡng thường gặp ở biển, trong đó *Pelagibacter ubique* thuộc họ Alphaproteobacteria, là loài vi khuẩn thường gặp ở vùng biển khơi. Loài này có thể tồn tại trong môi trường có nguồn dinh dưỡng thấp.

Vi khuẩn *Deltaproteobacteria* chiếm ưu thế ở vùng nước sâu.

Vi khuẩn *Euryarchaeota* có số lượng ít hơn nhưng thường gặp theo mùa và rất quan trọng trong quần xã nước mặt.

Vi khuẩn quang dị dưỡng sở hữu các tế bào proteorhodopsin để hấp thụ ánh sáng mặt trời và nguồn C từ protein hoặc lipid.

Động vật nguyên sinh như trùng roi, virus và nấm cũng đóng vai trò quan trọng ở tầng nước mặt.

Nấm trong hệ sinh thái biển xuất hiện ở dạng gắn vào đá, gắn vào mảnh vỏ của các loài giáp xác, bọt biển và san hô. Chúng cũng được tìm thấy ở vùng nước giàu Ca và đáy biển. Sự phân bố của nấm trong hệ sinh thái biển ít được nghiên cứu. Tuy nhiên ngày nay nấm biển được chú ý đến bởi chúng tạo ra các hợp chất thứ cấp hữu dụng. Nấm cũng được tìm thấy dưới độ sâu 5000 m ở biển Basin, Ấn Độ.

* Virus

Virus có số lượng nhiều trong mỗi thực thể sinh học trên Trái Đất và có số lượng thường nhiều gấp 10 lần so với vi khuẩn.

Trước năm 1989, người ta nghĩ rằng virus ở biển không tồn tại. Ngày nay virus ở biển được nghiên cứu nhiều và chúng đóng nhiều vai trò trong hệ sinh thái biển. Chúng liên quan đến hoạt động sinh tan của vi sinh vật, chuyển gene ngang và hoạt hóa quá trình trao đổi chất của vật chủ.

Virus gây nhiễm trên thực vật phù du giúp tuần hoàn các chất, gây sinh tan thực vật phù du, cung cấp nguồn dinh dưỡng cho sinh vật tiêu thụ.

Virus biển còn lây nhiễm cho động vật lớn như cá, cua và có thể gây thiệt hại kinh tế cho ngành thủy sản.

Virus chứa các gene của vật chủ và được biểu hiện trong quá trình xâm nhiễm làm thay đổi quá trình trao đổi chất của tế bào bị nhiễm để tạo ra virus mới. Virus ký sinh vi khuẩn lam có chứa các gene liên quan đến quá trình quang hợp. Những gene này biểu hiện trong quá trình virus xâm nhiễm vào vi khuẩn lam tạo cho tế bào chủ kéo dài quá trình quang hợp để tạo nhiều năng lượng giúp hình thành virus thế hệ mới. Một phần lớn quang hợp của khuẩn lam ở biển được thực hiện bởi các protein quang hợp được mã hóa bởi phage khuẩn lam.

Trước kia chúng ta chỉ phát hiện virus sau khi chúng gây bệnh ở người, động vật hoặc cây cối, nhưng bây giờ chúng ta chỉ cần tới các hồ, biển, đại dương và lấy nước, sau đó chúng ta lọc nước và phân lập virus.

Gần đây các nhà nghiên cứu cũng phát hiện ra trong nước thải chứa một số lượng lớn virus chưa từng được biết đến lên tới 234 loại, trong số đó có thể tiềm ẩn nguy cơ có hại cho con người.

7.3.2. Quần xã sinh vật phù du ở tầng đáy biển

Đáy biển có sinh cảnh đa dạng và được chia thành: trầm tích đáy biển mềm, đáy biển đá cứng và các miệng phun thủy nhiệt.

Trầm tích biển

Đáy biển là nơi lâng xuồng của các hợp chất hữu cơ trong nước cũng như xác của các loại sinh vật lớn, chúng cung cấp nguồn thức ăn cho các vi sinh vật dị dưỡng ở đáy biển. Nhiệt độ và các điều kiện hóa lý ở đáy biển gần như không đổi qua năm tháng. Tỷ lệ phân hủy các chất giảm dần theo độ sâu.

Quần xã vi sinh vật ở môi trường đáy biển:

+ Gammaproteobacteria: chiếm 25%.

+ Deltaproteobacteria: chiếm 16%.

+ Planctomycetales, Actinobacteria và Acidobacteria là ba ngành chiếm vị trí nhiều thứ ba. Chúng có hình thức dinh dưỡng tự dưỡng, dị dưỡng ký khí hoặc cần ít oxy (microaerobic heterotroph).

+ Vi khuẩn cổ và Eukarya là thành phần quan trọng ở đáy biển mềm.

+ Crenarchaeota và Euryarchaeota có số lượng nhiều ở lớp trầm tích.

+ Tảo cát ở đáy, trùng lỗ và radiolarien đóng góp quan trọng vào lưới thức ăn ở đáy biển.

Đáy biển cứng

Đáy biển còn được cấu tạo bởi đá bazan trải dài nhiều chỗ.

Vi sinh vật tự dưỡng đá hóa học: tự dưỡng bằng cách cố định C từ đá dùng năng lượng hóa học.

7.4. MÔI TRƯỜNG NƯỚC NGỌT

Môi trường nước ngọt bao gồm môi trường nước chảy: sông, suối và môi trường nước tĩnh: ao, hồ và đầm lầy.

Sông, suối

Vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn và tảo thường trú ngụ ở suối. Tảo và vi khuẩn quang dưỡng thường chiếm số lượng ưu thế ở môi trường suối với mật độ 10^2 đến 10^8 vi sinh vật/ml. Các vi sinh vật sản xuất này có mật độ nhiều hơn từ 10^6 đến 10^9 vi sinh vật/ml ở vùng nước cạn của suối có đá dưới đáy, nơi có ánh sáng mặt trời và nguồn dinh dưỡng vô cơ nồng độ cao.

Vi sinh vật dị dưỡng ở suối có mật độ thấp hơn từ 10^1 đến 10^6 vi sinh vật/ml. Vi sinh vật dị dưỡng ở sông có mật độ 10^4 đến 10^9 vi sinh vật/ml.

Hồ

Quần xã vi sinh vật trong hồ và các mối tương tác giữa chúng rất phức tạp và đa dạng. Mỗi quan hệ giữa sinh vật sản xuất và sinh vật tiêu thụ luôn diễn ra rất mạnh.

Các sinh vật sản xuất ở khu vực nước cạn gần bờ thường chiếm ưu thế với tảo chiếm số lượng lớn nhất, sau đó khuẩn lam.

Thực vật phù du chiếm ưu thế ở khu vực giữa hồ. Tùy thuộc vào cường độ và bước sóng ánh sáng xuyên qua độ sâu nước mà hình thành các quần xã vi sinh vật riêng biệt.

Các vi sinh vật dị dưỡng ở trong hồ phân hóa theo độ sâu. Có ba tầng từ trên xuống:

– Tầng vi sinh vật bề mặt – neuston: nơi chứa nồng độ các chất dinh dưỡng và vật chất hữu cơ cao.

– Tầng dị biệt nhiệt – thermocline: tầng giữa hồ có sự phân tầng về nhiệt và nơi các vật chất hữu cơ có khuynh hướng lắng xuống và tích lũy.

– Tầng trên của đáy hồ: nơi có các quần thể sinh vật dị dưỡng hiệu khí.

Ngoài các quần thể tảo và vi khuẩn lam, trong hồ, sông và suối còn có nấm, động vật nguyên sinh và virus. Chúng tương tác với nhau và đóng góp một phần quan trọng vào lối thức ăn.

Nấm sống ký sinh trên tảo phù du hạn chế tảo sinh trưởng với số lượng lớn và giúp ánh sáng mặt trời xuyên qua các cột nước sâu. Một số loài nấm sống trên bề mặt và tạo thành thảm nấm. *Zoophagus insidians* bám vào sợi tảo lục sống ở sông và hồ. Các sợi nấm dài trải dọc theo cột nước tạo thành các sợi dây bắt mồi. Khi con mồi, ví dụ trùng bánh xe, chạm vào sợi nấm, sợi nấm tiết ra chất nhầy để bẫy con mồi. Sợi nấm sẽ mọc nhanh trong miệng của con mồi và tạo thành hệ sợi nấm hấp thụ các chất dinh dưỡng trong cơ thể con mồi.

Động vật nguyên sinh là loài ăn các vi sinh vật quan trọng trong môi trường nước. Chúng ảnh hưởng đến số lượng của tảo và vi khuẩn vì mỗi động vật nguyên sinh tiêu thụ hàng trăm vi khuẩn hoặc tảo hàng ngày.

Quần thể virus và vật chủ của chúng luôn biến động cùng chiều. Số lượng virus trong môi trường nước ngọt nhiều hơn môi trường nước mặn. Vật chủ của virus môi trường nước ngọt rất đa dạng: vi khuẩn, vi tảo, động vật nguyên sinh và đại sinh vật. Như virus trong môi trường nước mặn, virus nước ngọt làm chết 20 – 60% số lượng vi khuẩn.

Quần thể virus và động vật nguyên sinh góp phần điều hòa mật độ và sinh khối của các quần xã vi khuẩn và tảo trong môi trường nước.

7.5. KIỂM SOÁT VÀ NGĂN NGỪA Ô NHIỄM NƯỚC Ở VIỆT NAM

7.5.1. Thực trạng

Hiện nay, ở nước ta có 108 lưu vực sông, với khoảng 3.450 con sông, suối tương đối lớn (chiều dài khoảng 10 km trở lên). Tổng lượng nước mặt trung bình khoảng từ 830 – 840 tỷ m³, trong đó có hơn 60% lượng nước được bắt nguồn từ nước ngoài, chỉ có khoảng từ 310 – 320 tỷ m³ được sản sinh trên lãnh thổ Việt Nam. Cùng với sự đô thị hóa nhanh và phát triển công nghiệp, các vấn đề môi trường như rác thải, nhất là tình trạng ô nhiễm nước

ngày càng trở nên trầm trọng, ảnh hưởng tới hiệu quả và tính cạnh tranh sản phẩm; ảnh hưởng tới sức khỏe của người dân.

Theo số liệu thống kê của Bộ Y tế và Bộ Tài nguyên và Môi trường, trung bình mỗi năm có tới 9000 người tử vong vì nguồn nước ô nhiễm; 200 nghìn trường hợp được phát hiện ung thư, mà một trong những nguyên nhân là do sử dụng nước bị ô nhiễm.

Hiện tại, hầu hết các sông chính ở Việt Nam đều bị ô nhiễm, trong đó ô nhiễm chủ yếu các vùng trung và hạ lưu; trong đó khu vực tập trung đông dân cư và các khu công nghiệp hiện tượng ô nhiễm diễn ra nghiêm trọng hơn. Đặc biệt, mức độ ô nhiễm tăng cao vào mùa khô, khi lượng nước chảy vào các con sông giảm. Ngoài ô nhiễm nguồn nước mặt, thì nguồn nước dưới đất cũng đang phải đối mặt với những vấn đề, như: nhiễm mặn, nhiễm thuốc trừ sâu, các chất có hại khác. Bên cạnh đó, trong những năm gần đây, nước biển Việt Nam cũng đã có dấu hiệu bị ô nhiễm do sự ô nhiễm từ các lưu vực sông, do các hoạt động phát triển kinh tế vùng cửa sông, ven biển...

Việt Nam hiện có hơn 774 đô thị, trong đó có hai đô thị đặc biệt; 15 đô thị loại một; 14 đô thị loại hai; 53 đô thị loại ba; 65 đô thị loại bốn và còn lại là đô thị loại năm. Tuy nhiên, tỷ lệ số dân đô thị hưởng dịch vụ thoát nước mới chiếm khoảng 60% và tỷ lệ nước thải sinh hoạt được xử lý mới đạt 12%. Điều hình như tại hai thành phố lớn Hà Nội và TP. Hồ Chí Minh, phần lớn nước thải sinh hoạt (khoảng 600 nghìn m³/ngày) và công nghiệp (khoảng 240 nghìn m³/ngày) không được xử lý, đổ thẳng vào các ao, hồ, sau đó chảy ra các con sông lớn tại vùng chau thổ sông Hồng và sông Mê Kông. Ngoài ra, nhiều nhà máy và cơ sở sản xuất, các lò mổ cũng không được trang bị hệ thống xử lý nước thải. Ngay cả các bệnh viện thải khoảng 7000 m³/ngày, cũng chỉ có 30% là được xử lý.

7.5.2. Nguyên nhân

Nguyên nhân dẫn đến tình trạng ô nhiễm nguồn nước, chủ yếu là do ô nhiễm nước thải sinh hoạt, vì hiện nay việc thu gom, xử lý nước thải sinh hoạt từ các hộ gia đình còn hạn chế, chỉ có một số thành phố lớn mới có hệ thống công trình thu gom, xử lý tập trung được một phần nhỏ, còn lại hầu hết nước thải từ các hộ dân đều xả trực tiếp vào hệ thống cống, rãnh, sông ngòi. Tại các khu công nghiệp, việc đầu tư và áp dụng công nghệ xử lý nước thải chưa đáp ứng yêu cầu, với 70% các khu công nghiệp không có hệ thống xử lý nước thải tập trung, hoặc một số cơ sở sản xuất có xử lý nước thải nhưng không đạt quy chuẩn cho phép. Ngoài ra, việc sử dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật, phân bón hóa học trong sản xuất nông nghiệp; hoạt động nuôi trồng thủy sản ô ạt, thiếu quy hoạch, không tuân thủ quy trình kỹ thuật trong nhiều năm qua, đã gây nhiều tác động tiêu cực tới chất lượng nguồn nước; môi trường nước bị ô nhiễm chất hữu cơ, phát triển một số loài sinh vật gây bệnh và xuất hiện một số tảo độc...

7.5.3. Tác hại của ô nhiễm nguồn nước

Hậu quả chung của tình trạng ô nhiễm nước là tỷ lệ người mắc các bệnh cấp và mạn tính liên quan đến ô nhiễm nước như viêm màng kết, tiêu chảy, ung thư... ngày càng tăng. Người dân sinh sống quanh khu vực ô nhiễm ngày càng mắc nhiều loại bệnh tình nghi là do dùng nước bẩn trong mọi sinh hoạt. Ngoài ra, ô nhiễm nguồn nước còn gây tổn thất lớn cho các ngành sản xuất kinh doanh, các hộ nuôi trồng thủy sản.

Các nghiên cứu khoa học cũng cho thấy, khi sử dụng nước nhiễm arsen để ăn uống, con người có thể mắc bệnh ung thư, trong đó thường gặp là ung thư da. Ngoài ra, arsen còn gây nhiễm độc hệ thống tuần hoàn khi uống phải nguồn nước có hàm lượng arsen 0,1 mg/l. Vì vậy, cần phải xử lý nước nhiễm arsen trước khi dùng cho sinh hoạt và ăn uống.

Người nhiễm chì lâu ngày có thể mắc bệnh thận, thần kinh, nhiễm Amoni, Nitrat, Nitrit gây mắc bệnh xanh da, thiếu máu, có thể gây ung thư. Metyl tert-butyl ete (MTBE) là chất phụ gia phổ biến trong khai thác dầu lửa có khả năng gây ung thư rất cao. Nhiễm Natri (Na) gây bệnh cao huyết áp, bệnh tim mạch, lưu huỳnh gây bệnh về đường tiêu hóa, Kali, Cadimi gây bệnh thoái hóa cột sống, đau lưng. Hợp chất hữu cơ, thuốc trừ sâu, thuốc diệt côn trùng, diệt cỏ, thuốc kích thích tăng trưởng, thuốc bảo quản thực phẩm, phosphor... gây ngộ độc, viêm gan, nôn mửa. Tiếp xúc lâu dài sẽ gây ung thư nghiêm trọng các cơ quan nội tạng.

Chất tẩy trắng Xenon peroxide, sodium percarbonate gây viêm đường hô hấp, oxalate kết hợp với calcium tạo ra calcium oxalate gây đau thận, sỏi mật. Ví khuẩn, ký sinh trùng các loại là nguyên nhân gây các bệnh đường tiêu hóa, nhiễm giun, sán. Kim loại nặng các loại: titan, sắt, chì, cadimi, arsen, thủy ngân, kẽm gây đau thần kinh, thận, hệ bài tiết, viêm xương, thiếu máu.

7.5.4. Biện pháp khắc phục

Để ngăn chặn, khắc phục và xử lý có hiệu quả những hành vi gây ô nhiễm môi trường nước, cần thực hiện đồng bộ một số giải pháp chủ yếu sau đây:

– **Giữ sạch nguồn nước:** Thúc đẩy người dân nâng cao ý thức cộng đồng để giữ sạch nguồn nước bằng cách không được vứt rác bừa bãi, không thải trực tiếp vào nguồn nước sạch, không dùng phân tươi làm phân bón và nên sử dụng thuốc trừ sâu theo đúng hướng dẫn. Cần hạn chế tối đa việc sử dụng các hóa chất gây ô nhiễm môi trường, đặc biệt là môi trường nước rất quan trọng đối với con người.

– **Tiết kiệm nước sạch:** Nhằm giảm sự lãng phí khi sử dụng nước thì nên tắt vòi nước khi không sử dụng, kiểm tra, bảo dưỡng và cải tạo lại những đường ống dẫn nước hay những bể chứa nước nhằm chống sự thất thoát của nước. Nên sử dụng những nguồn nước từ thiên nhiên như nước mưa vào việc cọ rửa, tưới cây tránh sử dụng nguồn nước máy vì rất lãng phí.

– **Xử lý phân thải:** Cần có những kế hoạch thu gom với hồ ủ vệ sinh hợp lý, tránh tình trạng xả tràn lan trực tiếp ra môi trường xung quanh gây ô nhiễm.

– **Xử lý rác sinh hoạt và chất thải khác:** Nên có những phương tiện chứa rác có nắp đậy kín, đủ sức chứa, nhất là những rác hữu cơ ở gia đình, khu tập thể cũng như nơi công cộng, đồng thời cần có những biện pháp sinh học xử lý hợp vệ sinh để tránh tình trạng gây ô nhiễm nguồn nước.

– **Xử lý nước thải:** Cần có hệ thống xử lý nước thải sinh hoạt (cống ngầm kín) rồi đổ ra hệ thống cống chung, tránh tình trạng xả tràn lan gây ô nhiễm. Nước thải công nghiệp, y tế cần phải xử lý theo quy định môi trường trước khi thải ra cộng đồng (hình 7.9).

Việc cung cấp nước sạch và đầy đủ là một trong những điều kiện cần thiết nhất bảo vệ sức khỏe cho con người. Ngoài ra thì bảo đảm nguồn nước sạch và vệ sinh môi trường cũng đã góp phần không nhỏ được 80% bệnh tật. Để sử dụng được nguồn nước sạch tinh khiết nhất, mỗi gia đình nên sử dụng máy lọc nước nhằm tránh những bệnh tật do nguồn nước gây ra.



Hình 7.9. Nước sông ô nhiễm vì rác thải (trái) Nước thải được xử lý theo kỹ thuật “Màng vi sinh tầng chuyển động – MBBR” (<http://doctorhouses.com/xu-ly-nuoc-thai-benh-vien>).

Tóm lại, tình trạng ô nhiễm môi trường nước ở Việt Nam tuy nghiêm trọng nhưng vẫn còn có thể cứu vãn nếu mỗi người dân biết góp sức của mình, chung tay bảo vệ môi trường nước. Hãy hô vang khẩu hiệu "Vì môi trường xanh – sạch – đẹp" và cũng là vì cuộc sống của chính chúng ta cũng như các thế hệ sau.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Cũng nhu đất, nước tự nhiên là một môi trường rất thuận lợi cho vi sinh vật tồn tại và phát triển. Sự phát triển của vi sinh vật trong nước phụ thuộc vào một số yếu tố như nhiệt độ, pH, nồng độ O₂..., trong đó quan trọng hơn cả là thức ăn trong nước. Nước càng bị bẩn do các bã hữu cơ – nghĩa là càng nhiều thức ăn – thì càng chứa nhiều vi sinh vật. Điều này ta sẽ thấy rõ khi nghiên cứu từng loại nước.

– Nước ngầm (nước mạch) có ít vi sinh vật là do nước đã được thẩm qua các lớp đất dày, vi sinh vật và các thức ăn hữu cơ được giữ lại trong lớp đất này. Nước ngầm càng sâu

thì càng sạch. Các giếng mạch nếu tìm được nguồn mạch tốt, sâu và có bảo vệ để tránh nhiễm bẩn ở bờ thì sẽ cho ta nguồn nước rất tốt cho việc ăn uống.

– Nước ao, hồ trùm hợp bị nhiễm phân, rác rưởi có nhiều chất hữu cơ thì số lượng chủng loại vi sinh vật tăng nhiều.

– Nước ở trong những hồ, biển lớn bụi bị lắng chìm nên số lượng vi sinh vật ít hơn.

– Nước ở những vùng sông, ngòi gần dân cư thì số lượng vi sinh vật nhiều hơn vùng xa dân cư.

Nước trong tự nhiên có khả năng tự làm sạch do tác dụng của ánh sáng mặt trời và do sự cạnh tranh sinh tồn mà các VSV hủy diệt lẫn nhau, hoặc là do chất kháng sinh của các thực vật thủy sinh tiết ra.

Nước cũng là môi trường thích hợp cho nhiều loại VSV phù du và tầng đáy, vì nước có đầy đủ các chất hữu cơ, không khí, nhiệt độ thích hợp, chất sinh trưởng, phát triển của VSV và các sinh vật khác.

Các sinh vật sản xuất, sinh vật tiêu thụ, sinh vật dị quang dưỡng trong môi trường nước (đại dương, biển, sông, suối, hồ...) có các kiểu dinh dưỡng phức tạp, đa dạng và phong phú. Chúng là tác nhân làm biến đổi thành phần nước.

Nước cũng là nguồn truyền bệnh nguy hiểm như vi khuẩn thương hàn (*Salmonella typhi*, trực khuẩn lỵ (*Shigella spp.*), phẩy khuẩn tả (*Vibrio cholerae*)... Ngoài những vi sinh vật sống trong nước, còn có những vi sinh vật gây bệnh do người và động vật làm ô nhiễm. Các vi sinh vật gây bệnh này chỉ tồn tại trong nước một thời gian nhất định. Chúng tồn tại trong nước lâu hay nhanh tùy theo nguồn nước, tính chất, nhiệt độ, pH... của nước.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Sự phân bố của nước trên Trái Đất? Vai trò của các VSV bề mặt?
2. Cho biết mối quan hệ chủ yếu giữa VSV với các sinh vật khác trong tầng neuston?
3. Quần xã vi sinh vật ở môi trường đáy biển? Chức năng chính của các sinh vật đáy biển?
4. Cơ sở khoa học của sự phân giải các hợp chất hữu cơ trong nước ngọt?
5. Vai trò của VSV trong các vòng tuần hoàn C, N trong môi trường nước?
* *Chọn một đáp án đúng nhất*
6. Trong loại thủy vực nào sau đây những sự thay đổi về nhiệt độ khí hậu theo mùa sẽ dẫn đến sự phân tầng rõ rệt về hóa học và về vi sinh vật?
 - a. Các đại dương;
 - b. Các hồ phú dưỡng;
 - c. Các hồ nghèo chất dinh dưỡng;
 - d. Các dòng sông chảy nhanh.

7. Vi sinh vật nào chịu trách nhiệm đối với tính acid của hệ thống nước acid từ mỏ?
- a. *Clostridium botulinum*; b. *Salmonella typhimurium*;
 - c. *Themus aquaticus*; d. *Thiobacillus thiooxidans*;
 - e. *Pseudomonas aeruginosa*.
- * *Điền vào chỗ trống*
8. Thuật ngữđược sử dụng để mô tả đặc tính tiêu thụ oxy của một mẫu nước đặc trưng.
9. Tảo trôi nổi hoặc lơ lửng tự do trong nước được gọi là.....
10. Quần xã VSV biển bị chiếm ưu thế, nếu nói về số lượng và sinh khối, bởi rất nhiều vi khuẩn nhỏ được gọi là.... hoặc

Chương 8

VI SINH VẬT MÔI TRƯỜNG CỰC TRỊ

Mục tiêu

- Nêu được những thích ứng của vi sinh vật để tồn tại trong các môi trường cực trị.
- Tầm quan trọng nghiên cứu vi sinh vật trong môi trường cực trị.

8.1. MÔI TRƯỜNG CỰC TRỊ

Trong tự nhiên, ở những môi trường bình thường – nơi có các điều kiện thuận lợi cho hầu hết cơ thể sống (về chất dinh dưỡng, nhiệt độ, pH, oxy...) – thường có một khu hệ vi sinh vật phong phú về chủng loại và đóng đúc về số lượng. Ví dụ: trong 1 gam đất ở tầng canh tác có thể có khoảng hơn 20 tỷ vi khuẩn, vài chục triệu vi nấm, vài chục nghìn vi tảo; trên cơ thể chúng ta, trong 1 cm² da của vùng trán có thể có tới 40.000 vi khuẩn *Staphylococcus epidermidis*, còn ở vùng các ngón chân thì số vi khuẩn này là hơn một triệu; đó là chưa kể các vi sinh vật khác.

Mặt khác, ở những môi trường cực trị (extreme environments) với điều kiện rất khắc nghiệt như nhiệt độ rất cao hoặc rất thấp, pH rất acid hoặc rất kiềm, độ mặn cao, áp suất cao, nghèo dinh dưỡng, không có oxy..., nơi mà mọi động vật và thực vật không thể tồn tại, vẫn có một số vi sinh vật sinh trưởng. Ví dụ: *Pyrobacterium brockii* ưa nhiệt sinh trưởng từ 80 đến 115 °C, ngược lại loài *Planococcus halocryophilus* OR1 ở khu vực bị đóng băng vĩnh cửu trên đảo Ellesmere Canada sinh trưởng được ở -15 °C. Trong môi trường nước mặn, loài *Halobacterium salinarium* ưa mặn có thể phát triển được trong các dung dịch có nồng độ muối NaCl cao đến 17 – 23%, *Thiobacillus thiooxidans* phát triển ngay ở pH = 0, thích hợp ở pH = 2,0 – 2,5 thuộc nhóm tự dưỡng nhờ năng lượng oxy hóa S, H₂S thành SO₄, hiếu khí bắt buộc.

8.2. MÔI TRƯỜNG NHIỆT ĐỘ THẤP

* Thung lũng khô McMurdo ở châu Nam Cực: Nhiệt độ không khí ở bề mặt trung bình hàng năm là -27,6 °C và nhiệt độ đất bề mặt trung bình hàng năm là -26,1 °C. Hệ sinh thái của các hố ở đây được bao phủ bởi lớp băng dày từ 3 – 5 m (hình 8.1).

Vi sinh vật ở hố Fryxell thuộc thung lũng khô McMurdo ở Nam Cực:

– Số lượng vi khuẩn oxy hóa S đạt 200 tế bào/ml tại độ sâu 9,5 m, phần lớn liên quan đến *Thiobacillus thioparus*. Vi khuẩn khử sulfate cũng được tìm thấy ở các cột nước băng phân tích gene mã hóa enzyme reductase dị hóa sulfite.

– Vi sinh vật tạo khí methane (methanogens) và vi sinh vật chuyên hóa methane như là nguồn năng lượng (methanotrops) cũng được tìm thấy.



Hình 8.1. Lớp băng bao phủ ở hồ Vanda thuộc thung lũng khô McMurdo, Nam Cực.

* Ứng dụng các chất hoạt tính sinh học từ vi sinh vật sống môi trường nhiệt độ thấp:

– Các vi sinh vật sống ở môi trường khí hậu lạnh có những biệt hóa để thích ứng với điều kiện. Chúng ta có thể khai thác các lợi ích tiềm năng để phục vụ cho cuộc sống của loài người. Các vi sinh vật này tổng hợp các enzyme thích ứng với điều kiện lạnh nên có các đặc tính cấu trúc đặc hiệu làm cho chúng có tính linh hoạt cao ở nhiệt độ thấp khi so sánh với các enzyme của các loài vi sinh vật sống ở điều kiện nhiệt độ thường. Các enzyme này hoạt động với hiệu suất cao ở nhiệt độ thấp, khi tăng nhiệt độ chúng sẽ bắt hoạt.

Ứng dụng các enzyme này trong công nghệ sinh học với hai đặc tính: hoạt hóa mạnh ở nhiệt độ thấp và tính ổn định thấp khi tăng nhiệt độ. Nhiệt độ thấp thường ổn định cho các chất phản ứng không bền, các phản ứng xảy ra ở nhiệt độ thấp thường yêu cầu ít năng lượng đưa vào nên hạ giá thành. Để tắt phản ứng chỉ cần tăng nhiệt độ.

Các loại enzyme đã được sử dụng trong công nghiệp: α -amylase; cellulase; β -galactosidase; lipase; protease và xylanase.

8.3. MÔI TRƯỜNG NHIỆT ĐỘ CAO

* **Vi khuẩn *Thermus aquaticus***

– Thomas Dale Brock và cộng sự đã phân lập được vi khuẩn *Thermus aquaticus* trong suối nước nóng tại Công viên Quốc gia Yellowstone, Montana, Hoa Kỳ. Chúng được dùng để sản xuất Taq DNA polymerase (Taq) là enzyme xúc tác cho phản ứng tổng hợp DNA đã được nghiên cứu khá kỹ về tính chất. Thậm chí gene của Taq đã được nhân dòng và

biểu hiện thành công trong *E. coli*. Nhờ tính chất bền với nhiệt, hoạt tính polymerase và khả năng bổ sung gốc adenosin (A) vào đầu 3' của chuỗi DNA dạng sợi kép nên sau khi được phát hiện, Taq đã trở thành công cụ hết sức hữu ích của các nghiên cứu sinh học phân tử.

– *Thermus aquaticus* có thể sinh trưởng trong điều kiện từ 40 đến 79 °C, nhiệt độ lý tưởng 70 °C.

– Enzyme bền nhiệt DNA polymerase từ loài vi khuẩn này được sử dụng trong phản ứng khuyếch đại gene – PCR.

* Các chi vi khuẩn ở suối nước nóng có nhiệt độ lên đến 100 °C: *Thermus*, *Methanobacterium*, *Sulfolobus*, *Pyrodictium* và *Pyrococcus*. Loài vi khuẩn cổ *Pyrolobus fumarii* có thể tồn tại đến nhiệt độ 113 °C.

Môi trường ở suối nước nóng Dragon thuộc công viên quốc gia Yellowstone, Mỹ

– Nguồn nước mang tính acid với pH: 3,1.

– Nhiệt độ: từ 66 – 73 °C.

– Chứa 80 µM carbon hữu cơ hòa tan.

– Các nguyên tố S từ các dòng địa nhiệt tạo thành các kết tủa keo tụ tạo ra đặc điểm phân biệt của các dòng kênh chảy ra từ suối nước nóng (hình 8.2).



Hình 8.2. Suối Dragon, Công viên Quốc gia Yellowstone, Hoa Kỳ.

– Các lớp keo tụ này là nền tảng cho các quần xã vi sinh vật tuần hoàn lưu huỳnh.

– Có hai nhóm vi sinh vật chính:

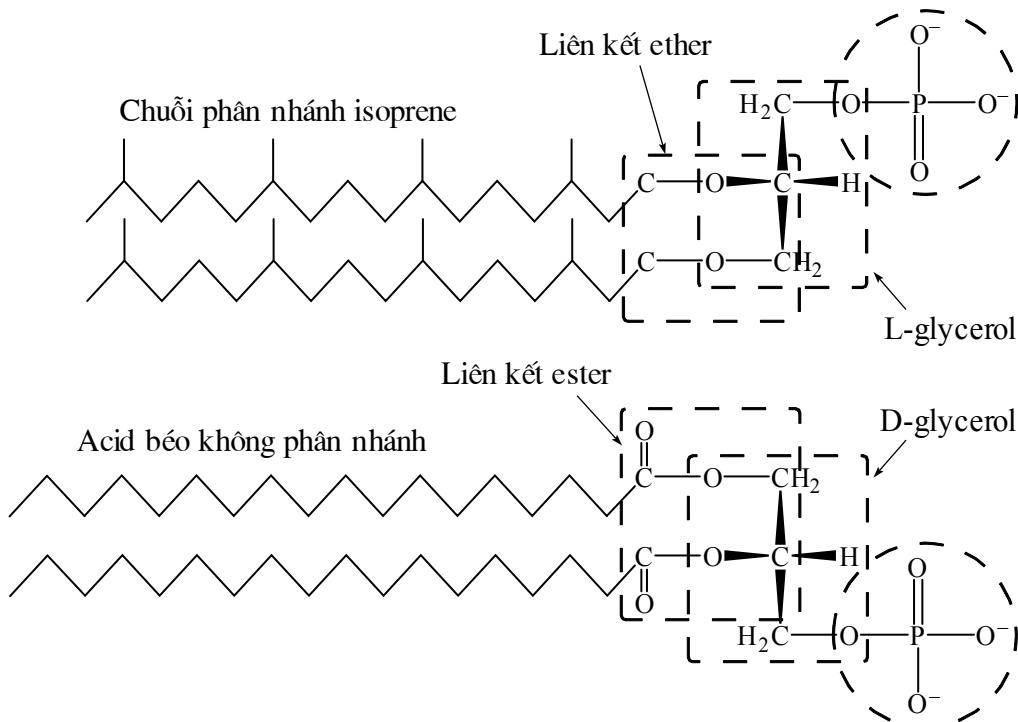
+ Hai quần thể vi khuẩn cổ hô hấp lưu huỳnh: *Caldisphaera draconis* và *Acidilobus sulfurireducens*.

+ Chi *Hydrogenobaculum*: vi khuẩn hóa tự dưỡng oxy hóa lưu huỳnh.

Có nhiều cơ chế giúp vi sinh vật sống sót ở nhiệt độ cao mà không làm phân hủy protein, màng tế bào và vật chất di truyền. Mấu chốt ở đây là chức năng enzyme được duy trì ở trạng thái cân bằng giữa tính ổn định phân tử và tính mềm dẻo chức năng ở môi trường lạnh cũng như nóng. Một trong những cơ chế đáp ứng chung liên quan đến các protein ổn định với nhiệt độ giúp cho các protein khác được gấp lại và lưu trữ với hình thái chức năng sau khi bị phân hủy bởi nhiệt độ. Các vi khuẩn có những đáp ứng đặc hiệu để tăng tính ổn định của protein ở nhiệt độ cao bao gồm:

- + Tăng số lượng các cầu nối disulfide;
- + Tăng môi tương tác giữa các peptide thơm;
- + Tăng liên kết hydro giữa các peptide.

Các vi sinh vật tồn tại ở môi trường nhiệt độ cực trị phần lớn thuộc vi khuẩn cổ. Màng tế bào của vi khuẩn cổ khác màng tế bào của vi khuẩn (hình 8.3). Màng tế bào vi khuẩn cổ bền với nhiệt độ hơn màng tế bào vi khuẩn. Đối với acid nucleic, các vi sinh vật bền với nhiệt sản xuất enzyme DNA gyrase đặc biệt. Enzyme này giúp DNA cuộn xoắn dương tính, vì vậy ổn định với nhiệt.



Hình 8.3. So sánh màng phospholipid của vi khuẩn cổ (trên) và vi khuẩn (dưới) (Pepper et al., 2015).

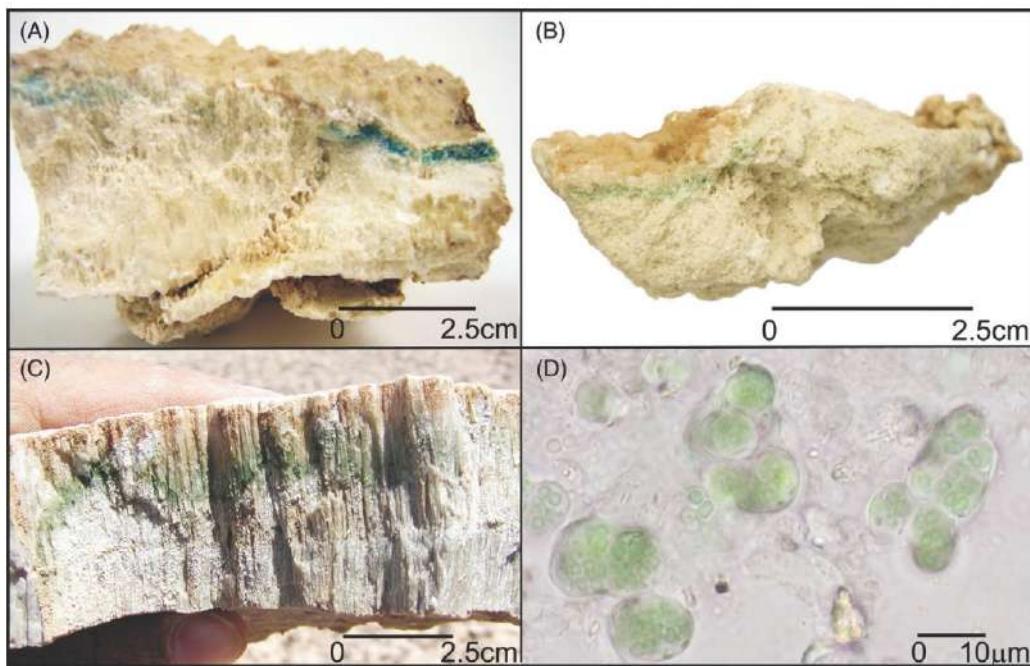
Vi khuẩn *Thermus thermophilus* HB27 được phân lập ở suối nước nóng tại Nhật Bản. Vi khuẩn này có hệ thống hoán vị DNA cho phép nó tiếp nhận DNA từ vi khuẩn, vi khuẩn cổ và sinh vật có nhân. Hệ thống này có khả năng tiếp nhận DNA với tốc độ cao, khoảng 40 kbp/giây. Hệ thống hoán vị DNA giúp vi sinh vật đáp ứng nhanh với môi trường

cực trị. Hơn thế nữa, hoán vị DNA có thể là một trong những công cụ hữu hiệu để chuyển các tính trạng sinh lý và chịu nhiệt của các sinh vật trong môi trường cực trị.

Có rất nhiều ứng dụng trong công nghệ sinh học của các enzyme được phân lập từ sinh vật chịu nhiệt. Ứng dụng được kể đến đầu tiên là enzyme DNA polymerase được sử dụng trong kỹ thuật khuếch đại gene – PCR. Các ứng dụng khác bao gồm các enzyme protease, lipase, amylase và xylanase được sử dụng trong nông nghiệp, sản xuất giấy, ngành dược, tinh sạch nước, xử lý môi trường sinh học, khai thác khoáng và công nghiệp dầu mỏ.

8.4. MÔI TRƯỜNG KHÔ VÀ BỨC XẠ CỰC TÍM

Các sa mạc trên thế giới có khí hậu điển hình nóng và lạnh, nửa khô hạn đến khô hạn cực trị. Ở đây có điều kiện cực trị nên hạn chế tối đa sinh vật sản xuất và đa dạng của sự sống. Các yếu tố hạn chế sự sống vi sinh vật ở sa mạc khô hạn bao gồm lượng nước có thể dùng được, nhiệt độ và cường độ tia bức xạ cực tím. Các sa mạc khô hạn và nửa khô hạn thường đặc trưng bởi giá trị lượng mưa trung bình hàng năm từ 25 – 200 mm, trong khi đó sa mạc khô hạn cực trị có lượng mưa trung bình hàng năm nhỏ hơn 25 mm. Lượng nước có thể dùng được ở sa mạc không những được xác định bởi lượng mưa trung bình hàng năm mà còn kết hợp với các ảnh hưởng của lượng giáng thủy (P) và khả năng bốc hơi nước (PET). Các khu vực siêu khô hạn có tỷ lệ P/PET nhỏ hơn 0,05.



Hình 8.4. Các mẫu thạch cao với vi khuẩn lam. (A) Mẫu thạch cao AT326b từ sa mạc Atacama Desert; (B) Mẫu thạch cao DG từ sa mạc Mojave; (C) Sợi thạch cao mẫu JB1 từ Al-Jafr Basin, Jordan; (D) Hình ảnh từ kính hiển vi quang học của vi khuẩn lam *Chroococcidiopsis* mẫu AT326b từ sa mạc Atacama.

Sa mạc Atacama, Chile là một trong những sa mạc khô nhất trên thế giới. Tại khu vực trung tâm siêu khô hạn của sa mạc không có mưa xảy ra với chu kỳ hàng năm đến hàng chục năm. Bởi vì không có độ ẩm nên thực vật ở đây thưa thớt hay hoàn toàn không có, tạo nên môi trường đất có lượng carbon hữu cơ cực kỳ thấp. Lượng carbon hữu cơ trong đất ở các sa mạc: 0,7% ở sa mạc Mojave, Mỹ; 0,17% ở sa mạc Sahara gần Abu Simbel, Ai Cập và từ 0,02 đến 0,09% ở mẫu đất dọc theo đường cắt ngang qua trung tâm khô hạn cực trị của sa mạc Atacama Desert. Trong khi đó lượng carbon hữu cơ trong đất vùng ôn đới chiếm từ 1 đến 5%.

Ở các sa mạc, các quần xã vi sinh vật đá sinh học sống trên bề mặt đá và các khe đá ở phía dưới được nghiên cứu. Đây là các vi khuẩn dị dưỡng được duy trì bởi các vi sinh vật tự dưỡng cố định nitơ, bao gồm các vi khuẩn lam và tảo lục (hình 8.4).

Vi khuẩn lam *Chroococcidiopsis* có ưu thế trong chịu khô hạn và bức xạ. Vi khuẩn lam *Nostoc* sp. có khả năng sống sót trong điều kiện khô trong thời gian vài tháng hay vài năm. Sự thích nghi với điều kiện khô là đặc trưng duy nhất trong các thích nghi với điều kiện cực trị như nhiệt độ, pH, áp suất. Bởi vì tế bào không sinh trưởng trong điều kiện khô và phần lớn của vòng đời có thể trải qua trạng thái khử nước. Vì vậy, các tế bào có các phương thức tồn tại trong điều kiện khô hạn hơn khả năng thực hiện các chức năng dưới điều kiện cực trị. Các phương thức để tồn tại bao gồm:

- + Có khả năng bảo vệ và sửa sai DNA khi bị phơi nhiễm bức xạ cực tím UV;
- + Duy trì sự ổn định của protein trong trạng thái khử nước;
- + Duy trì tính toàn vẹn của màng tế bào.

Cơ chế thích ứng đầu tiên của vi khuẩn lam là tạo ra màng bọc polysaccharide ngoại bào (EPS). Màng bọc này điều hòa thu nhận và mất nước, đóng vai trò như ma trận để ổn định các thành phần được tạo bởi tế bào đáp ứng điều kiện khô và có thể bảo vệ màng tế bào trong quá trình co rút và trương lên. Tế bào tạo ra một số phân tử để đáp ứng điều kiện khô hạn và phơi nhiễm phóng xạ. *Nostoc commune* có các protein có tính ổn định cao trong điều kiện khô hạn chiếm 70% tổng protein hòa tan. Tế bào *N. commune* chứa trehalose và saccharose có khả năng ổn định protein và bảo vệ tính toàn vẹn của màng tế bào trong quá trình mất nước.

Các quần xã vi sinh vật trong môi trường khô cằn không phụ thuộc nguồn C và N ngoại sinh vì sự hiện diện của vi sinh vật sản xuất quang tự dưỡng cố định nitơ.

Tầm quan trọng của nghiên cứu sinh vật có khả năng tồn tại trong môi trường khô hạn cực trị:

- Cung cấp hiểu biết về những địa điểm mà cuộc sống có thể tồn tại trong những khu vực khô hạn cực trị trên Trái Đất, từ đó giúp chúng ta thu hẹp và tập trung tìm kiếm sự sống ngoài Trái Đất.

- Mở rộng những hiểu biết về đa dạng vi sinh vật trong các khu vực khô hạn cực trị có thể sử dụng để đánh giá về lịch sử lượng mưa.

– Hy vọng xác định được các vi sinh vật oxy hóa khoáng có khả năng chịu được nhiệt độ và khô hạn trong các quần thể mới hiện diện ở các sa mạc khô hạn để có thể lợi dụng chúng cho các nhà máy khai thác khoáng nhằm tách chiết các khoáng chất như đồng từ quặng có nồng độ thấp.

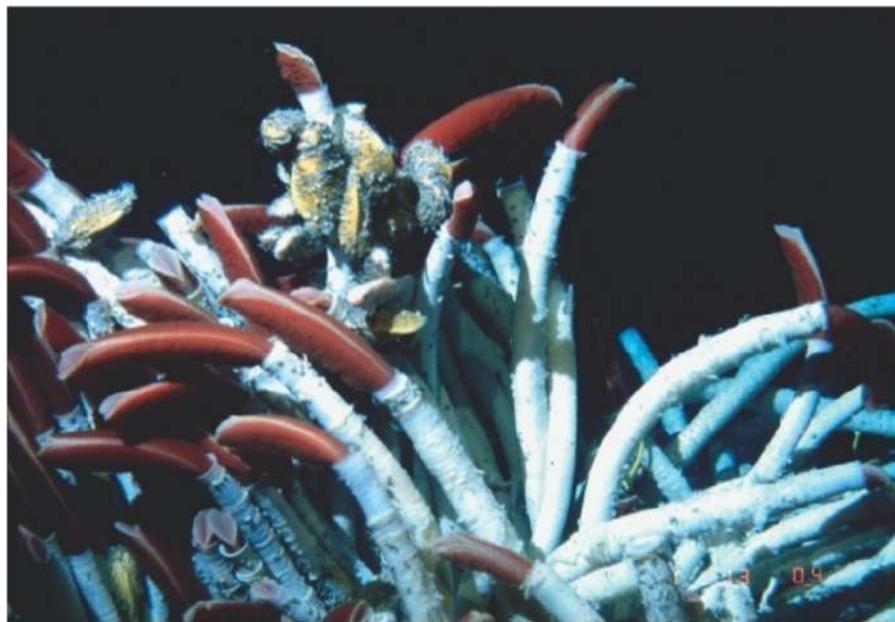
8.5. MÔI TRƯỜNG THIẾU ÁNH SÁNG

8.5.1. Các miệng phun thủy nhiệt ở đáy biển sâu

Các miệng phun thủy nhiệt ở đáy biển sâu lần đầu tiên được mô tả vào năm 1977 bởi các nhà địa chất. Các khu vực này nằm trên nền đại dương có sự đổi lưu nhiệt được tạo bởi magma, dòng nước nóng đan quyền với các dòng khoáng phun lên từ các đường nứt hay còn gọi là miệng phun thủy nhiệt. Nhiệt độ lên đến 400°C được tỏa ra từ các miệng phun với tốc độ 1 – 5 m/s.Thêm vào đó, các dòng từ miệng phun không chứa oxy, thể nồng khử cao, pH 2 – 4, giàu CO₂, H₂S, CH₄, H₂, Fe²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ và các kim loại chuyển tiếp khác.

Dòng thủy nhiệt từ các miệng phun rất nóng chứa nhiều khoáng thể nồng khử nên có nhiều biến thiên của chất nhận điện tử tạo nền tảng cho các quần xã vi sinh vật hóa tự dưỡng phát triển. Chúng duy trì sự sống cho toàn bộ quần xã dị dưỡng ở miệng phun từ vi sinh vật đến động vật. Vì vậy, mạng lưới thức ăn của quần xã ở miệng phun dựa vào hóa tự dưỡng, không giống quang tự dưỡng ở môi trường bề mặt.

Có ít nhất ba cơ chế để chuyển nguồn C và năng lượng từ các quần thể vi khuẩn hóa tự dưỡng đến các sinh vật tiêu thụ kế tiếp.



Hình 8.5. Quần thể giun ống *Riftia pachyptila* trưởng thành.

– Mỗi quan hệ nội cộng sinh giữa các vi khuẩn ở miệng phun với động vật không xương sống: loài giun ống *Riftia pachyptila* có hình dạng ống lớn và phát triển ở đáy biển (hình 8.5). Loài giun này không có miệng, ruột hay hệ thống tiêu hóa. Thay vì tiêu thụ vi khuẩn, loài giun này có bề mặt bên trong là nơi ở của vi khuẩn hóa tự dưỡng oxy hóa lưu huỳnh. Cơ thể loài giun chứa đầy máu có chứa lượng lớn hemoglobin có thể bám H₂S. Dòng máu này vận chuyển H₂S đến vi khuẩn. Vi khuẩn oxy hóa H₂S và cố định CO₂ tạo thành các hợp chất hữu cơ để nuôi sống loài giun ống.

– Mỗi quan hệ nuôi dưỡng vi khuẩn. Vi khuẩn được nuôi dưỡng bởi loài trai hoặc các loài động vật không xương sống trong phần phụ biệt hóa như xúc tu và mang. Những động vật không xương sống này thu hoạch và tiêu thụ vi khuẩn theo định kỳ, giữ lại một ít để bắt đầu mùa thu hoạch mới.

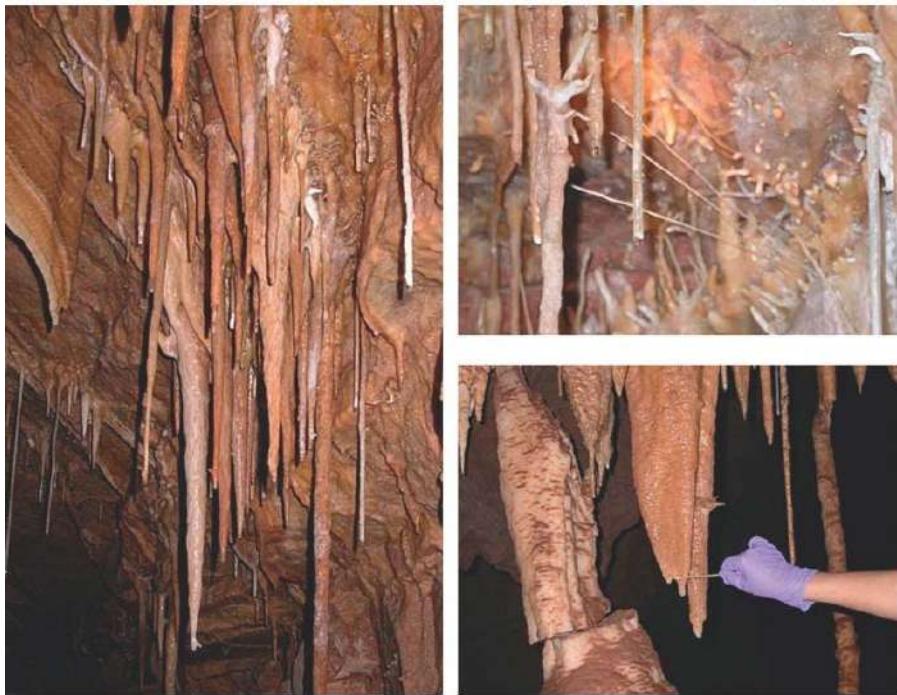
– Các sinh vật tiêu thụ bậc cao tiêu thụ trực tiếp các tế bào vi khuẩn tự do, như cua, giáp xác, cá ăn thịt hay các loài vi khuẩn khác tiêu thụ trực tiếp các sinh vật sản xuất tự dưỡng hóa học hoặc dị dưỡng hóa học.

Hang động đá vôi đại diện cho hệ sinh thái ngầm mà hoàn toàn không có sinh vật sản xuất quang hợp. Hang động thường có tính đặc trưng của địa hình đá vôi. Không có ánh sáng, hang động thường nhận nguồn C từ mặt đất nhờ dòng nước nhỏ giọt tạo nên sự phát triển thạch nhũ rất đẹp hoặc từ dòng chảy xuyên qua hang động ổn định hoặc tức thời. Tuy nhiên, đối với hang động ở sa mạc, các nguồn C hữu cơ từ ngoài vào theo giọt nước hoặc dòng chảy rất hạn chế, gây ra môi trường hạn chế dinh dưỡng.

Hang động Kartchner Caverns nằm ở sa mạc Sonoran, Arizona, Mỹ (hình 8.5). Phân tích pyrotag hoặc giải mã thế hệ mới với gần 2000 đơn vị phân loài (OTUs)/thạch nhũ chỉ ra rằng không hy vọng có độ đa dạng cao của vi khuẩn trên bề mặt thạch nhũ trong hang động Kartchner Caverns. Các đơn vị phân loài này được phân loại thành 21 ngành và 12 ngành khác đang tiếp tục nghiên cứu chúng là các sinh vật phát triển dị dưỡng chiếm ưu thế. Bằng chứng của vi khuẩn tự dưỡng hóa thạch xuất phát từ quan sát thư viện tạo dòng với trình tự đầy đủ của 16S rRNA. Vi khuẩn *Nitrospira* lấy năng lượng từ oxy hóa nitrite và vi khuẩn *Leptospirillum* lấy năng lượng từ oxy hóa sắt.

8.5.2. Hang động đá vôi ở sa mạc

Phân tích Metagenome được thực hiện để làm rõ cấu trúc quần xã và tìm kiếm bằng chứng động năng tiềm tàng duy trì độ đa dạng các quần xã vi sinh vật ở thạch nhũ. Vi khuẩn cổ đóng vai trò trong động lực học năng lượng ở hang động Kartchner Caverns (hình 8.6). Phân tích pyrotag 16S rRNA của các mẫu đất từ khắp thế giới cho thấy độ phong phú của vi khuẩn cổ là 2%. Độ phong phú của vi khuẩn cổ tỷ lệ nghịch với tỷ lệ C : N, có nghĩa là vi khuẩn cổ kháng lại hay thậm chí sinh sôi trong các điều kiện có dinh dưỡng thấp như được tìm thấy trong hang động Kartchner.



Hình 8.6. Thạch nhũ ở hang động Kartchner Caverns, Mỹ.

Lợi ích của nghiên cứu hệ sinh thái hang động như Kartchner Caverns mang lại:

– Môi trường ở hang động dưới mặt đất nghèo chất dinh dưỡng là nguồn sinh sống với một quần xã vi sinh vật tự dưỡng thạch hóa sinh sống theo chu trình tuần hoàn chất dinh dưỡng không bình thường.

– Quan sát vi sinh vật đặc trưng ở đây cho ta những hiểu biết về phương thức tồn tại của sự sống trong các hệ sinh thái khác nghèo chất dinh dưỡng như: đất dưới bờ mặt hay tầng đất ngâm nước, các sa mạc khô hạn hay thậm chí các hệ sinh thái ngoài Trái Đất. Ví dụ như Kartchner cung cấp hình mẫu cho đánh giá vai trò của vi khuẩn cổ trong hệ sinh thái đất nghèo chất dinh dưỡng.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Môi trường cực trị (extreme environments), nơi mà mọi động vật và thực vật không thể tồn tại, vẫn có một số vi sinh vật sinh trưởng. Các môi trường cực trị ấy là những nơi có một hay nhiều điều kiện rất khắc nghiệt như nhiệt độ rất cao hoặc rất thấp, môi trường khô và bức xạ cực tím, môi trường thiếu ánh sáng...

Nghiên cứu môi trường cực trị cung cấp những hiểu biết về những địa điểm mà sự sống có thể tồn tại trong những môi trường cực trị trên Trái Đất, từ đó giúp chúng ta thu hẹp và tập trung tìm kiếm sự sống ngoài Trái Đất, cũng như ứng dụng chúng trong kỹ thuật di truyền.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

- Ý nghĩa của việc nghiên cứu hệ vi sinh vật trong môi trường cực trị đối với sản xuất và đời sống?
- Ứng dụng của việc nghiên cứu VSV trong môi trường khô hạn và bức xạ cực tím?
- Đặc điểm của khu hệ sinh vật trong môi trường thiếu ánh sáng?

Chọn đáp án đúng nhất

- Đặc tính nào sau đây không phải là đặc tính của Thiomargarita namibiensis?
 - Nó được coi là vi khuẩn lớn nhất thế giới.
 - Nó tận dụng nitrate làm chất nhận điện tử trong một thời gian ngắn với sunfuahydro (được sử dụng làm chất cho điện tử) bằng cách sử dụng một khung bào lớn để tập trung nitrate.
 - Nó chuyển động tròn và chuyển động lên xuống bên trong một cái bao chứa các chất dinh dưỡng mà nó cần.
 - Tất cả các đặc điểm trên đều là đặc điểm của VSV lạ thường này.
- Xét về các đặc điểm sinh lý, sinh thái, vi khuẩn cổ có thể phân thành:
 - Vi khuẩn cổ sinh methane (methanogens);
 - Vi khuẩn cổ ưa nhiệt cao (hyper-thermophiles);
 - Vi khuẩn cổ ưa mặn (halophiles);
 - Vi khuẩn cổ ưa acid (acidophiles);
 - Vi khuẩn cổ ưa nhiệt độ cao và ưa acid cao.
 - Cả 5 nhóm trên.

** Diện vào các chỗ trống*

- Các nhân tố gây sốc như nhiệt độ cao và độ muối cao có thể tạo ra các môi trường ... (a)..... không thuận lợi với nhiều sinh vật. Các cơ thể tồn tại được trong những môi trường như vậy được gọi là.....(b).....
- Các vi khuẩn sinh methane sẽ sử dụng...(a).....và ... (b).....để tạo ra methane.
- Các môi trường nước được gọi là môi trường.....(a)..... vì rằng oxy khuếch tán chậm chạp theo nước. Hơn nữa, độ hòa tan oxy trong nước bị hạn chế. Điều này có thể dẫn đến sự tạo thành.....(b).....(nồng độ oxy thấp) và các vùng.....(c)....(không có oxy, các vùng này cho phép các VSV đặc thù phát triển).

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. *Pyrolobus fumari* là loại vi khuẩn cổ có khoảng nhiệt độ sinh trưởng từ 90 đến 113 °C, trong đó nhiệt độ tối ưu ở 105 °C, sống tại các “cột khói đen” ở các vùng biển sâu trên 1000 m.
2. *Cenarchacum symbiosum* thuộc nhóm ưa lạnh (psychrophiles) sinh trưởng nhanh nhất ở nhiệt độ 15 °C hoặc thấp hơn – được phân lập ở ngoài khơi bờ biển California.
3. *Thermoplasma volcanium* sinh trưởng tối ưu ở 55 °C và pH = 2, được phân lập từ các vùng có núi lửa ở nhiều nơi trên thế giới.
4. *Picrophilus oshimae* và *P. toridus* thuộc nhóm ưa acid (extreme acidophile) – có pH tối ưu cho sinh trưởng là 3 hoặc thấp hơn nữa – đã được phân lập từ những vùng có núi lửa ở miền bắc Nhật Bản.

Chương 9

VI SINH VẬT TRONG XỬ LÝ PHẾ THẢI

Mục tiêu

- Hiểu được một cách đầy đủ những tác hại to lớn của rác thải sinh hoạt, phế thải, nước thải sinh hoạt và công nghiệp.
- Trang bị kiến thức cho người học về bản chất của từng loại chất thải, nước thải.
- Nắm và vận dụng được những hiểu biết vào thực tiễn sản xuất và đời sống các biện pháp, quy trình xử lý chất thải, nước thải bằng công nghệ sinh học chống ô nhiễm môi trường và có thể tái sử dụng.

9.1. NGUỒN GỐC PHẾ THẢI VÀ BIỆN PHÁP XỬ LÝ

9.1.1. Nguồn gốc phế thải

Phế thải là gì? Phế thải là sản phẩm loại bỏ được thải ra trong quá trình hoạt động sản xuất, chế biến của con người.

Phế thải có nhiều nguồn khác nhau: rác thải sinh hoạt; rác thải đô thị; tàn dư thực vật; phế thải do quá trình sản xuất, chế biến nông – công nghiệp; phế thải từ các nhà máy công nghiệp như nhà máy giấy, khai thác chế biến than, nhà máy đường, nhà máy thuốc lá, nhà máy bia, nước giải khát, các lò mổ, các nhà máy xí nghiệp chế biến rau quả, đồ hộp...

Việt Nam là nước nông nghiệp có nguồn phế thải sau thu hoạch rất lớn, rất đa dạng. Chương trình 1 triệu tấn đường đã để lại hàng chục vạn tấn bã mía, mùn mía và tàn dư phế thải từ sản xuất, chế biến mía ra đường. Ngành công nghiệp chế biến xuất khẩu cà phê đã thải ra môi trường hơn 20 vạn tấn vỏ/năm. Trên đồng ruộng, nương rẫy hàng năm để lại hàng triệu tấn phế thải là rơm rạ, lõi ngô, cây săn, thân lá thực vật... Ngoài ra còn có tới hàng triệu tấn rác thải sinh hoạt. Tất cả nguồn phế thải này một phần bị đốt, còn lại trở thành rác thải, phế thải gây ô nhiễm nghiêm trọng môi trường và nguồn nước, trong khi đất đai lại thiêu trâm trọng nguồn dinh dưỡng cho cây và hàng năm chúng ta phải bỏ ra hàng chục triệu USD để mua phân hóa học ở nước ngoài.

Phế thải được phân thành ba nhóm sau:

- + Phế thải hữu cơ;
- + Phế thải rắn;
- + Phế thải lỏng.

9.1.2. Biện pháp xử lý phế thải

Hiện nay nước ta có bốn biện pháp xử lý phế thải sau:

a) Biện pháp chôn lấp

Chôn lấp là phương pháp xử lý lâu đời, cổ điển và đơn giản nhất. Phương pháp này đòi hỏi nhiều diện tích đất và thời gian xử lý lâu, có mùi hôi thối, sinh ra các khí độc như CH₄, H₂S, NH₃ rò rỉ, làm ô nhiễm đất, ô nhiễm nguồn nước. Ở nhiều nước, để chống rò rỉ người ta xây bê tông, nhưng rất tốn kém và thời gian sử dụng bê tông không được lâu. Biện pháp này ngày càng bộc lộ nhiều khuyết điểm.

b) Biện pháp đốt

Đây là biện pháp tạm thời khi lượng phế thải quá nhiều. Biện pháp này gây ô nhiễm môi trường không khí rất nghiêm trọng, gây hiệu ứng nhà kính và các loại bệnh đường hô hấp, mặt khác biện pháp này rất tốn nguyên liệu đốt. Đốt rác cũng sinh ra dioxin.

c) Biện pháp thải ra hồ, sông ngòi và đổ ra biển

Đây là biện pháp rất nguy hiểm, gây ô nhiễm không khí, nguồn nước, tiêu diệt sinh vật sống dưới nước, gây ô nhiễm toàn cầu.



Hình 9.1. Biện pháp chôn lấp (trái), đốt (phải) gây ô nhiễm môi trường.

d) Biện pháp sinh học

Hiện nay biện pháp sinh học để xử lý chất thải là biện pháp tối ưu nhất đang được tất cả các nước sử dụng.

Biện pháp sinh học là dùng công nghệ VSV để phân hủy chất thải. Muốn thực hiện được biện pháp này, điều quan trọng nhất là phải phân loại được phế thải, vì trong chất thải còn nhiều phế liệu khó phân giải như túi polyethylene, vỏ chai lọ bằng thủy tinh và nhựa, các loại phế liệu rắn, bền phân giải lâu.

9.2. SỬ DỤNG VI SINH VẬT XỬ LÝ RÁC THẢI SINH HOẠT

9.2.1. Thành phần của rác thải sinh hoạt

Khác với rác thải, phế thải công nghiệp, rác thải sinh hoạt là một tập hợp không đồng nhất. Tính không đồng nhất biểu hiện ngay ở sự không kiểm soát được của các nguyên liệu ban đầu dùng cho sinh hoạt và thương mại. Sự không đồng nhất này tạo ra một số đặc tính rất khác biệt trong các thành phần của rác thải sinh hoạt.

Một trong những đặc điểm rõ nhất ở phế thải đô thị Việt Nam là thành phần các chất hữu cơ chiếm tỷ lệ rất cao 55 – 65%. Trong phế thải đô thị các cầu tử phi hữu cơ (kim loại, thủy tinh, rác xây dựng...) chiếm khoảng 12 – 15%. Phần còn lại là các thành phần khác. Cơ cấu thành phần cơ học trên của phế thải đô thị không phải là những tỷ lệ bất biến mà biến động theo các tháng trong năm và thay đổi theo mức sống của cộng đồng.

Ở các nước phát triển, do mức sống của người dân cao nên tỷ lệ thành phần hữu cơ trong rác thải sinh hoạt thường chỉ chiếm 35 – 40%. So với thế giới thì rác thải đô thị có tỷ lệ hữu cơ cao hơn rất nhiều nên việc xử lý rác thải sinh hoạt ở *Việt Nam bằng công nghệ VSV để sản xuất phân hữu cơ vi sinh là rất thuận lợi*.

Trong các thành phần hữu cơ của rác sinh hoạt, thành phần hóa học của chúng chủ yếu là C, H, O, N, S và các chất tro (bảng 9.1).

Bảng 9.1. Thành phần hữu cơ của rác thải đô thị (*)

Thành phần hữu cơ	Hàm lượng %					
	C	H	O	N	S	Tro
Thực phẩm	48, 0	6, 4	37, 6	2, 6	0, 4	5, 0
Giấy	43, 5	6, 0	44, 0	0, 3	0, 2	6, 0
Cartoon	44, 0	5, 9	44, 6	0, 3	0, 2	5, 0
Chất dẻo	60, 0	7, 2	22, 8	–	–	10, 0
Vải	55, 0	6, 6	31, 2	1, 6	0, 15	–
Cao su	78, 0	10, 0	–	2, 0	–	10, 0
Da	60, 0	8, 0	11, 6	10, 0	0, 4	10, 0
Gỗ	49, 5	6, 0	42, 7	0, 2	0, 1	1, 5

(*) Nguồn: Đề tài cấp Nhà nước KHCN 02 – 04.

Từ bảng trên cho thấy rác thải đô thị nếu để phân hủy một cách vô tổ chức thì môi trường, đặc biệt là nguồn nước sẽ bị ô nhiễm một cách trầm trọng. Ngược lại, nếu được xử lý tốt sẽ tạo ra nguồn dinh dưỡng khổng lồ trả lại cho đất, cung cấp dinh dưỡng cho cây, tạo ra được sự cân bằng về sinh thái.

9.2.2. Vi sinh vật phân giải rác thải sinh hoạt

9.2.2.1. Vi sinh vật phân giải hợp chất hữu cơ chứa cellulose

Trong tự nhiên, VSV phân giải cellulose vô cùng phong phú bao gồm vi khuẩn; nấm; xạ khuẩn; nguyên sinh động vật..

+ **Vi khuẩn:** Là nhóm VSV lớn nhất và cũng được nghiên cứu nhiều nhất. Từ thế kỷ XIX các nhà khoa học đã phát hiện thấy một số loại vi khuẩn ký khí có khả năng phân giải cellulose. Những năm đầu thế kỷ XX, người ta phân lập được các vi khuẩn hiếu khí cũng có khả năng này. Trong các vi khuẩn hiếu khí phân giải cellulose thì niêm vi khuẩn có vai trò lớn nhất, chủ yếu là các chi *Arzotobacter*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Vibrio*, *Cellvibrio*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Angiococcus*, *Polyangium*, *Sorangium*... (vi khuẩn hiếu khí).

Nhiều tác giả còn phân lập tuyển chọn trong đồng ủ phế thải có *Clostririum*, *Pseudomonas* chứa phức hệ enzyme cellulose. *Acteromobacter*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga* và *Sorangium*, *Sporocytophaga*.

+ **Nấm sợi:** Nấm sợi (hay nấm mốc) phân giải cellulose mạnh hơn vi khuẩn vì chúng tiết vào môi trường lượng enzyme ngoại bào nhiều hơn vi khuẩn. Vi khuẩn thường tiết vào môi trường phức hệ enzyme cellulase không hoàn chỉnh chỉ thủy phân được cơ chất như giấy lọc và CMC, còn nấm tiết vào môi trường hệ thống cellulase hoàn chỉnh nên có thể thủy phân cellulose hoàn toàn. Các loại nấm phân hủy cellulose mạnh là *Trichoderma*, *Penicillium*, *Phanerochate*, *Sporotrichum*, *Sclerotium*.

Nấm ưa nhiệt có thể tổng hợp các enzyme bền nhiệt hơn, sinh trưởng và phân giải nhanh cellulose. Nấm có thể phát triển ở pH = 3,5 – 6,6.

Nguồn carbon giúp cho nấm phân giải mạnh cellulose. Trong phế thải chứa nhiều nitrate cũng khích thích nấm phân giải cellulose, nguồn nitơ hữu cơ cũng giúp cho nấm phân giải cellulose mạnh hơn.

+ **Xạ khuẩn:** Xạ khuẩn có tác dụng phân giải phế thải khá mạnh. Người ta chia xạ khuẩn thành hai nhóm: xạ khuẩn ưa ám, chúng phát triển mạnh ở nhiệt độ 28 – 30 °C và xạ khuẩn ưa nhiệt, chúng có thể phát triển mạnh ở nhiệt độ 50 – 55 °C.

Trong đồng ủ phế thải người ta tìm thấy nhiều loại xạ khuẩn, đó là *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Nocardia*, *Actinopolyspora*, *Actinosynoema*.

9.2.2.2. Vi sinh vật phân giải hemicellulose

Vi sinh vật phân giải hemicellulose thường có trong dạ dày của động vật nhai lại như trâu bò, chủ yếu là các giống *Ruminococcus*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Butyvibrio*, *Clostridium* và nhiều loại nấm sợi như *Aspegillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

9.2.2.3. Vi sinh vật phân giải lignin

Vi sinh vật phân giải lignin là những giống có khả năng tiết ra enzyme ligninase, gồm có nấm *Basidiomycetes*, *Acomycetes*, nấm bất hoàn. Vi khuẩn gồm *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acinebacter* xạ khuẩn *Streptomyces*.

9.3. SỬ DỤNG VI SINH VẬT XỬ LÝ NƯỚC THẢI

9.3.1. Nguồn nước thải

Nước thải từ nhiều nguồn khác nhau: nước thải sinh hoạt; nước thải từ các nhà máy công nghiệp (nhà máy giấy, nhà máy dệt, nhà máy hóa chất, các nhà máy khai thác quặng, than, nhà máy đường, nhà máy bia...); nhà máy chế biến thực phẩm (các lò giết mổ, đông lạnh, đồ hộp xuất khẩu, hoa quả...).

Theo thống kê của Trung tâm Môi trường vệ sinh thủy sản, cứ 100 nghìn tấn nguyên liệu chế biến thủy hải sản xuất khẩu thì có 50 nghìn tấn phế thải rắn, 10 nghìn tấn thịt vụn kèm với 3 triệu m³ nước thải, ngoài ra còn nhiều hóa chất độc hại được thải ra môi trường trong quá trình chế biến sản xuất (Dự án TTM.TS 1998). Chỉ tính riêng vùng Đồng bằng sông Hồng, tổng sản lượng thịt hơi đạt 450 – 480 nghìn tấn, sản lượng thủy sản đạt 161 nghìn tấn, sản lượng rau quả đạt hàng trăm nghìn tấn (nguồn: Vũ Năng Dũng, NXB Nông nghiệp, 2001).

Theo tài liệu của nhà máy giấy Bãi Bằng – Phú Thọ, cứ sản xuất được 1000 tấn giấy phải thải ra 25 – 30 triệu m³ nước từ các cửa thải khác nhau: nước thải rửa gỗ, nước thải rửa do quá trình thủy phân và chưng cất, nước thải rửa trong quá trình tẩy bột kiềm, nước thải rửa trong quá trình trung hòa, nước thải rửa lò than... Trong các loại nước thải này chứa rất nhiều độc tố như các hợp chất hữu cơ, hợp chất chlor, sulfate, CaO, các acid dư thừa, các ion kim loại nặng độc hại (Hg, Cd, Pb, NaOCl), sạn, cát gỗ vụn...

Nước thải được phân làm hai loại chính sau:

9.3.1.1. Nước thải sinh hoạt

Là nguồn nước thải của các khu dân cư tập trung từ sinh hoạt của con người (ăn uống, tắm giặt, phân thải, nước tiểu của người) và gia súc gia cầm hàng ngày được thải ra vào các hệ thống cống rãnh của khu dân cư. Trong nước thải loại này chứa nhiều phân rác, các hợp chất hữu cơ và các muối hòa tan, đặc biệt là chứa nhiều loại VSV gây bệnh, các loại trứng giun, sán. Đây là loại nước thải phổ biến và số lượng rất lớn. Mức độ ô nhiễm của nó phụ thuộc vào trình độ văn minh, trình độ dân trí của từng khu dân cư, từng quốc gia.

9.3.1.2. Nước thải công nghiệp

Là nước thải của một nhà máy hay khu công nghiệp tập trung với các loại hình sản xuất rất khác nhau, vì vậy trong nước thải công nghiệp rất đa dạng, rất nhiều chủng loại hợp chất khác nhau và độ độc hại gây ô nhiễm môi trường cũng rất khác nhau.

+ Các nhà máy chế biến thực phẩm như đường, rượu bia, đồ hộp, lò giết mổ gia súc gia cầm, nhà máy chế biến thủy sản...

+ Các nhà máy sản xuất nguyên vật liệu như giấy, xà phòng, công nghiệp dệt, công nghiệp hóa dầu, sản xuất các loại hóa chất...

Trong nước thải công nghiệp, ngoài chứa hàm lượng cao các hợp chất hữu cơ như protein, các dạng carbohydrate, dầu mỡ (từ các công nghệ chế biến thực phẩm), hemicellulose, lignin (công nghiệp sản xuất giấy), còn có các hợp chất hóa học khó phân hủy như các hợp chất vòng thơm có N, các alkyl benzenesulfonate (công nghiệp sản xuất bột giặt), các loại dung môi, các kim loại nặng như Pb, Hg, As...

Nhìn chung nước thải công nghiệp so với nước thải sinh hoạt có các chỉ số BOD (nhu cầu oxy sinh hóa) và COD (nhu cầu oxy hóa học) cao hơn rất nhiều. Nước thải công nghiệp có độ ô nhiễm cao hơn so với nước thải sinh hoạt.

Theo Luật Bảo vệ Môi trường, mỗi nhà máy, xí nghiệp phải có công trình xử lý nước thải trước khi xả ra hệ thống thoát nước chung. Thực tế hiện nay cho thấy, quy định nói trên chưa được thực hiện nghiêm túc nên dẫn tới ô nhiễm hệ thống nước mặt, nước ngầm, ô nhiễm môi trường sinh thái khá trầm trọng ở nhiều nơi trên đất nước ta.

9.3.2. Khu hệ vi sinh vật và các tác nhân gây bệnh trong nước thải

9.3.2.1. Khu hệ vi sinh vật trong nước thải

Mỗi loại nước thải có hệ VSV đặc trưng. Nước thải sinh hoạt do chứa nhiều chất hữu cơ giàu dinh dưỡng dễ phân giải nên chứa nhiều vi khuẩn, thông thường từ vài triệu đến vài chục triệu tế bào trong 1 ml.

– Vi khuẩn gây thối: *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bac. cereus*, *Bac. subtilis*, *Enterobacter cloacae*...

– Các vi khuẩn phân giải đường, cellulose, urea: *Bac. cellosae*, *Bac. mesentericus*, *Clostridium*, *Micrococcus urea*, *Cytophaga sp.*

– Các vi khuẩn gây bệnh đường ruột: Nhóm Coliform là VSV chỉ thị cho mức độ ô nhiễm phân trong nước ở mức độ cao, có thể dao động từ vài chục nghìn đến vài trăm nghìn tế bào/ml nước thải.

Trong nước thải hữu cơ VSV hình ống giữ vai trò quan trọng, phải kể đến vi khuẩn *Sphaerotilus natans*, thường hay bị nhầm với nấm nước thải, nó phủ lên bề mặt tế bào một lớp nước cực bẩn, thường tạo thành các sợi hoặc các búi, khi bị vỡ ra sẽ trôi nổi đầy trên mặt nước. Nhóm này thường phát triển mạnh ở nước nhiều oxy. Ngoài ra, vi khuẩn *Sphaerotilus natans* thường thấy ở các nhà máy thải ra nhiều cellulose và nhà máy chế biến thực phẩm. Bên cạnh vi khuẩn, người ta còn gặp nhiều loại nấm, nhất là nấm men *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Leptomitus lacteus*, *Fusarium aqueducteum*...

Ngoài ra còn có vi khuẩn oxy hóa lưu huỳnh như: *Thiobacillus*, *Thiothrix*, *Beggiatoa*; vi khuẩn phản nitrate hóa: *Thiobacillus denitrificans*, *Micrococcus denitrificans*.

Trong nước thải chứa dầu, người ta tìm thấy vi khuẩn phân giải hydrocarbon: *Pseudomonas*, *Nocardia*...

Trong nước thải còn có tập đoàn tảo khá phong phú, chúng thuộc tảo silic: Bacillariophyta, tảo lục: Chlorophyta, tảo giáp: Pyrrophyta.

9.3.2.2. Các tác nhân gây bệnh trong nước thải

Ngoài những nhóm sinh lý khác nhau của VSV có trong nước thải như đã nói ở trên, người ta còn đặc biệt quan tâm đến sự có mặt của các VSV gây bệnh, đặc biệt ở những vùng có hệ thống vệ sinh chưa hợp lý.

Các VSV gây bệnh thường không sống lâu trong nước thải vì đây không phải là môi trường thích hợp, nhưng chúng tồn tại trong một thời gian nhất định tùy từng loài để gây bệnh truyền nhiễm cho người và động, thực vật. Trong số những VSV gây bệnh nguy hiểm phải kể đến một số VSV sau:

+ Vi khuẩn gây bệnh thương hàn (*Salmonella dyenteria*), vi khuẩn này sống được trong nước tùy thuộc vào chất dinh dưỡng và nhiệt độ của nguồn nước. Thông thường chúng sống được trong vòng 20 – 25 ngày vào mùa hè và 60 – 70 ngày vào mùa đông.

+ Vi khuẩn gây bệnh kiết ly (*Shigella*), sống tối đa 10 – 15 ngày ở nhiệt độ 20 – 22 °C trong nước thải, ở nhiệt độ càng thấp chúng càng sống lâu hơn.

+ Xoắn khuẩn (*Leptospira*), gây nên những chứng bệnh sưng gan, sưng thận và tê liệt hệ thần kinh trung ương. Chúng có thể sống 30 – 33 ngày trong nước thải ở nhiệt độ 25 °C.

+ Vi khuẩn đường ruột (*E. coli*), có thể sống trong nước bẩn 9 – 14 ngày ở nhiệt độ 20 – 22 °C.

+ Vi khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*), sống tối đa được 3 tuần trong nước thải ở nhiệt độ 20 – 25 °C.

+ Phẩy khuẩn tả (*Vibrio cholerae*), sống tối đa 13 – 15 ngày trong nước thải.

+ Các virus *Adenovirus*, *Echo*, *Coxsackie* sống tối đa 15 ngày.

Các vi khuẩn gây bệnh trên phân tán chậm trong đất khô, trong nước phân tán theo chiều ngang cũng ít (khoảng 1 m), trong khi đó ảnh hưởng theo chiều sâu khá nhiều (khoảng 3 m).

9.3.3. Vai trò tự làm sạch nước thải của vi sinh vật

Một hiện tượng rất được quan tâm trong tự nhiên đó là quá trình tự làm sạch nguồn nước thải do các yếu tố sinh học, trong đó VSV đóng vai trò chủ chốt.

Các ao hồ, sông, ngòi, biển luôn trong tình trạng bẩn với mức độ khác nhau do rác thải và nước thải của con người. Nhờ quá trình tự làm sạch mà các chất bẩn thường xuyên được loại ra khỏi môi trường nước.

Quá trình tự làm sạch nước thải nhờ các quá trình vật lý – hóa học là sự sa lắng và oxy hóa giữ một vai trò quan trọng, song đóng vai trò quyết định vẫn là quá trình sinh học. Tham gia vào quá trình tự làm sạch có rất nhiều chủng, giống sinh vật, từ các loại cá, chim, đến các động vật nguyên sinh và VSV.

Tại chỗ nước thải đổ ra thường tụ tập nhiều loại chim, cá, chúng sử dụng các phế thải từ đồ ăn và rác làm thức ăn; tiếp sau đó là các động vật bậc thấp như ấu trùng của côn trùng, giun và nguyên sinh động vật, chúng sử dụng các hạt thức ăn cực nhỏ làm nguồn dinh dưỡng. Song vai trò của vi khuẩn và nấm men có tính quyết định quá trình tự làm sạch này, chúng đã phân hủy chuyển hóa các chất hữu cơ thành các chất đơn giản hơn và cuối cùng là các muối vô cơ, CO₂. Nói cách khác là trong điều kiện thuận lợi cho VSV, chúng có khả năng khoáng hóa một cách hoàn toàn nhiều chất bẩn hữu cơ để làm sạch nước.

Bên cạnh vi khuẩn, nấm men, còn có nấm mốc và tảo đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển hóa các chất bẩn gây ô nhiễm môi trường khác. Trong nước thải, thông qua hoạt động sống của mình, tảo cung cấp oxy cho môi trường, ngoài ra còn tiết vào môi trường chất kháng sinh là vũ khí lợi hại để tiêu diệt mầm bệnh có trong nước thải, nhất là khu hệ VSV gây bệnh đường ruột. Tảo còn gây cản trở sự phát triển của một số VSV gây bệnh khác, cạnh tranh nguồn dinh dưỡng của chúng; đồng thời tiết ra một số chất kích thích cho sự phát triển của VSV hữu ích trong môi trường nước thải. Trong nước thải, vai trò rất to lớn của tảo còn là ở khả năng hấp thụ các kim loại nặng như Pb, Cd, As, Cu... và các tia phóng xạ.

Thông thường protein, đường, tinh bột được phân giải nhanh nhất, còn cellulose, lignin, mỡ, sáp bị phân giải chậm hơn nhiều và sự phân giải xảy ra không hoàn toàn, vì vậy hệ VSV cũng thay đổi theo quá trình phân giải và thành phần các hợp chất chứa trong nước thải đó để làm sạch môi trường nước.

Cường độ tự làm sạch nước thải còn phụ thuộc vào một số yếu tố sau:

+ Cường độ làm sạch thường cao ở những nơi có dòng chảy mạnh do có sự trao đổi khí giữa nước và môi trường không khí xảy ra mạnh. Khi đó mặt nước có nhiều oxy. Ngược lại ở những thủy vực thiếu sự chuyển động của nước như ao tù thì nước thải bị ứ đọng, thiếu oxy, sự phân giải các chất bẩn kém. Quá trình tự làm sạch bị cản trở.

+ Cường độ tự làm sạch nước thải cũng thay đổi theo mùa: mùa hè cường độ xảy ra mạnh hơn mùa đông, ánh sáng nhiều thì cường độ tự làm sạch xảy ra mạnh hơn.

+ Cường độ tự làm sạch nước thải ở vùng nhiệt đới xảy ra mạnh hơn ở vùng ôn đới, vùng hàn đới.

9.4. CÁC PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ PHẾ THẢI

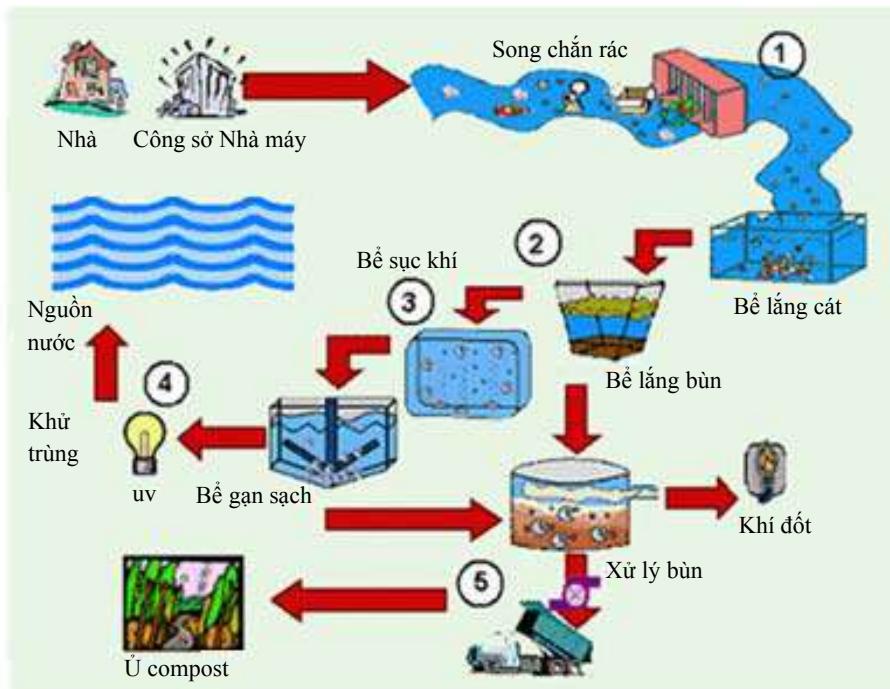
9.4.1. Xử lý nước thải

Hiện nay xử lý nước thải có các phương pháp chủ yếu sau:

9.4.1.1. Xây dựng trạm xử lý nước thải

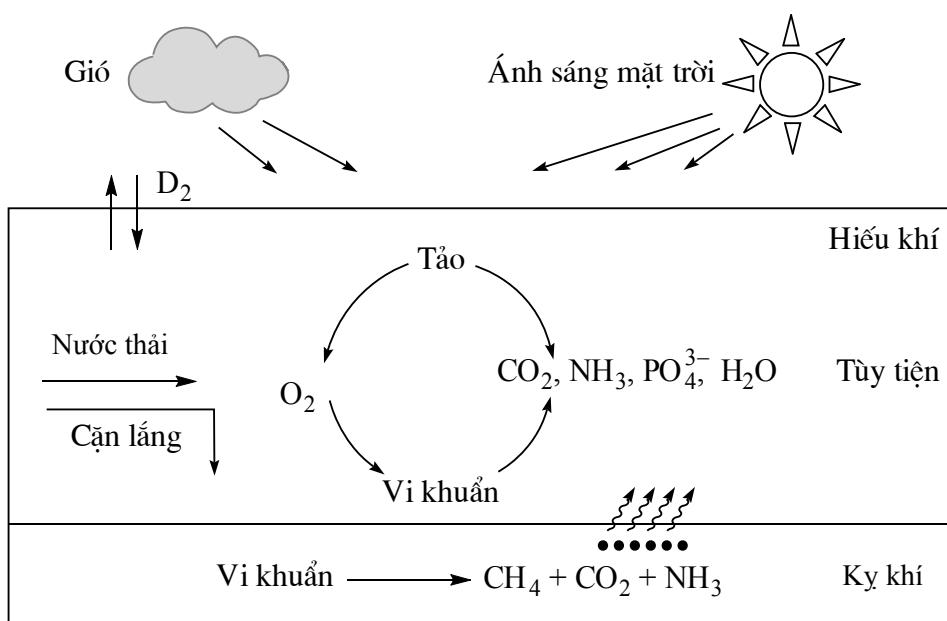
Muốn xây dựng được trạm xử lý nước thải phải dựa trên nguyên lý tổ hợp công trình, xử lý nước thải là một chuỗi liên hoàn các hạng mục công trình xử lý từng cấp nhằm giảm

dẫn các chất muối loại bỏ trong bùn thải nước thải cho đến khi chúng đạt được các yêu cầu sạch cần thiết. Lượng nước sau khi đi qua tổ hợp công trình có thể được xả ra nguồn nước chung hoặc quay vòng một phần hay toàn thể trở lại nhà máy sản xuất (hình 9.2).

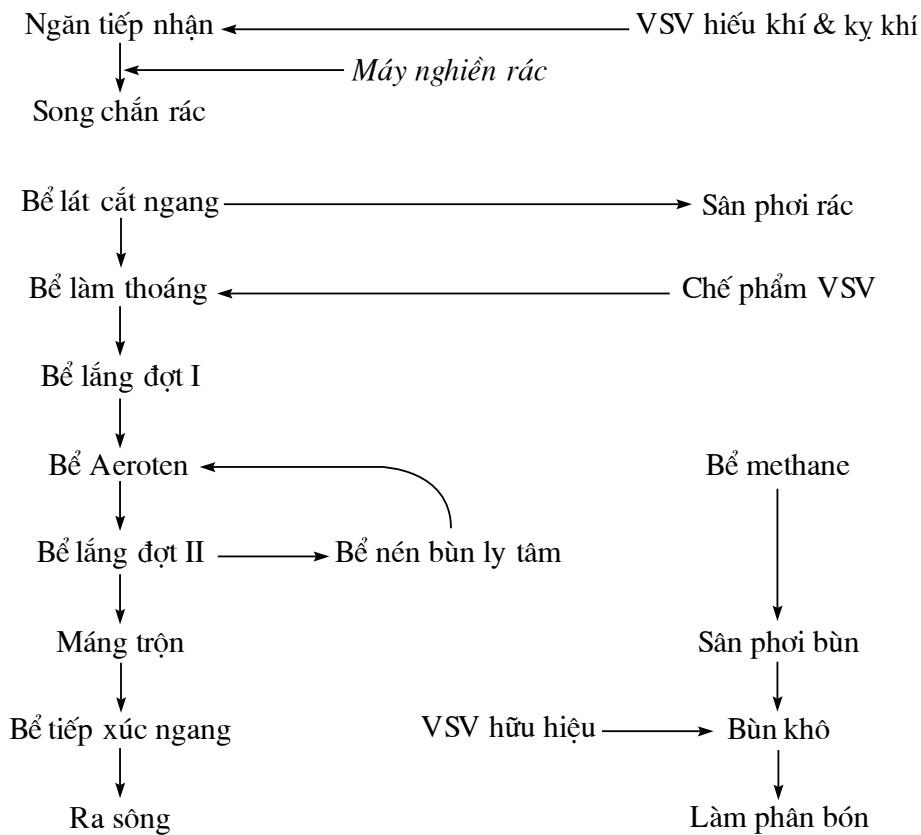


Hình 9.2. Tổ hợp một công trình xử lý nước thải (<http://www.yeumoitruong.vn/>).

Sơ đồ xử lý nước thải sinh hoạt và công, nông nghiệp bằng bể lắng.



Hình 9.3. Sơ đồ hoạt động ở hồ oxy hóa.



Hình 9.4. Sơ đồ xử lý nước thải sinh hoạt bằng công nghệ vi sinh vật.

9.4.1.2. Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học

a) Khái niệm về xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học

Trong các biện pháp xử lý nước thải, biện pháp sinh học được quan tâm nhiều nhất và cũng cho hiệu quả cao nhất. So với biện pháp vật lý và hóa học thì biện pháp sinh học chiếm vai trò quan trọng về quy mô cũng như giá thành đầu tư, do chi phí cho một đơn vị khối lượng chất khử là ít nhất. Đặc biệt xử lý nước thải bằng phương pháp sinh học sẽ không gây tái ô nhiễm môi trường – một nhược điểm của biện pháp hóa học hay mắc phải.

Biện pháp sinh học là sử dụng đặc điểm rất quý của VSV, đặc điểm này đã thu hút thuyết phục được các nhà khoa học và các nhà đầu tư, đó là khả năng đồng hóa được nhiều nguồn cơ chất khác nhau của VSV: tinh bột, cellulose, các nguồn dầu mỏ và dẫn xuất của nó đến các hợp chất cao phân tử như protein, lipid, các kim loại nặng như chì, thủy ngân, arsen...

Thực chất của phương pháp sinh học là nhờ hoạt động sống của VSV (sử dụng các hợp chất hữu cơ và một số chất khoáng có trong nước thải làm nguồn dinh dưỡng và năng lượng) để biến đổi các hợp chất hữu cơ cao phân tử trong nước thải thành các hợp chất đơn giản hơn. Trong quá trình dinh dưỡng này VSV sẽ nhận được các chất làm nguyên liệu để xây dựng cơ thể, do vậy sinh khối VSV tăng lên.

Biện pháp sinh học có thể làm sạch hoàn toàn các loại nước thải công nghiệp chứa các chất bẩn hòa tan hoặc phân tán nhỏ. Do vậy, biện pháp này thường dùng sau khi loại bỏ các tạp chất phân tán thô ra khỏi nước thải. Đối với nước thải chứa các tạp chất vô cơ thì biện pháp này dùng để khử các muối sulfate, muối ammonium, muối nitrate là những chất chưa bị oxy hóa hoàn toàn.

b) Điều kiện để xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học

Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học có nhiều ưu điểm và được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, việc áp dụng biện pháp này cần những điều kiện nhất định sau: thành phần các hợp chất hữu cơ trong nước thải phải là những chất dễ bị oxy hóa, nồng độ các chất độc hại và các kim loại nặng phải nằm trong giới hạn cho phép. Chính vì vậy khi xử lý nước thải cần điều chỉnh nồng độ các chất này sao cho phù hợp.

Ngoài ra, các điều kiện môi trường như lượng O₂, pH, nhiệt độ của nước thải... cũng phải nằm trong giới hạn nhất định để bảo đảm sự sinh trưởng, phát triển bình thường của các VSV tham gia trong quá trình xử lý nước thải (bảng 9.2).

Bảng 9.2. Nồng độ giới hạn cho phép của các chất trong nước thải để xử lý theo biện pháp sinh học

Tên chất	Ccp*	Tên chất	Ccp*
Acid acrylic	100	Mỡ bôi trơn	100
Rượu amylic	3	Acid butyric	500
Aniline	100	Đồng (ion)	0,4
Acetaldehyde	750	Metacrylamide	300
Acid benzoic	150	Rượu methylic	200
Benzene	100	Acid monochloracetic	100
Vanadium (ion)	5	Arsen (ion)	0,2
Vinyl acetate	250	Nickel (ion)	1
Vinilinden chlorur	1000	Sản phẩm của dầu	100
Hydroquinol	15	Pyridine	400
Acid dichloacetic	100	Triethylamine	85
Dichlocyclohexane	12	Trinitrotoluene	12
Diethylamine	100	Triphenylphosphate	10
Diethyleneglycol	300	Phenol	1000
Caprolactan	100	Formaldehyde	160
Rezorcín	100	Chlorobenzene	10
Amon rodanua	500	Toluene	200

Tên chất	Ccp*	Tên chất	Ccp*
Chì (ion)	1	Sulfanol	10
Acid stearic	300	Antimon (ion)	0,2
Sulfur (theo H ₂ S)	20	Crezol	100
Kerosene (dầu lửa)	500	Tributylphosphate	100
Lactonitryl	160		

* Ghi chú: Ccp* là nồng độ giới hạn cho phép của các chất (g/m³ nước thải)

c) Thành phần và cấu trúc các loại vi sinh vật tham gia xử lý nước thải

Yếu tố quan trọng nhất của biện pháp sinh học để xử lý nước thải là sử dụng bùn hoạt tính (activated sludge) hoặc màng VSV.

Bùn hoạt tính hoặc màng VSV là tập hợp các loại VSV khác nhau. Bùn hoạt tính là bông màu vàng nâu dễ lắng, có kích thước 3 – 150 mm. Những bông này bao gồm các VSV sống và cơ chất rắn (40%). Những VSV sống bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc, một số nguyên sinh động vật, dòi, giun...

Màng vi sinh vật phát triển ở bề mặt các hạt vật liệu lọc có dạng nhầy dày từ 1 – 3 mm hoặc lớn hơn. Màu của nó thay đổi theo thành phần của nước thải, từ vàng sáng đến nâu tối. Màng vi sinh vật cũng bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm mốc và nguyên sinh động vật khác. Trong quá trình xử lý, nước thải sau khi qua bể lọc sinh vật có mang theo các hạt của màng sinh vật với các hình dạng khác nhau, kích thước từ 15 – 30 nm có màu vàng xám và nâu.

Muốn đưa bùn hoạt tính vào các thiết bị xử lý, cần thực hiện một quá trình gọi là “khởi động”, là quá trình làm cho loại bùn gốc ban đầu (thường kém về khả năng lắng và hoạt tính) được nuôi dưỡng để trở thành loại bùn có hoạt tính cao và có tính kết dính tốt. Có thể gọi đó là quá trình “hoạt hóa” bùn hoạt tính. Cuối thời kỳ “khởi động”, bùn sẽ có dạng hạt. Các hạt này có độ bền cơ học khác nhau, có mức độ vỡ ra khác nhau khi chịu tác động khuấy trộn. Sự tạo hạt của bùn ở dạng này hay dạng khác phụ thuộc vào tính chất và nồng độ của bùn gốc, chất lượng môi trường cho thêm vào để hoạt hóa bùn, phương thức hoạt hóa và cuối cùng là thành phần các chất có trong nước thải.

Loại bùn gốc tốt nhất lấy ở các thiết bị xử lý nước thải đang hoạt động. Nếu không có loại này thì có thể lấy loại bùn chưa thích nghi như từ các bể xử lý theo kiểu tự hoại, bùn công rãnh, kênh rạch ô nhiễm nhiều, bùn phân lợn, phân bò đã phân hủy... Các VSV chứa trong bùn này nghèo về số lượng, nhưng đa dạng về chủng loại.

d) Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện tự nhiên

Cơ sở khoa học của biện pháp này là dựa vào khả năng tự làm sạch của đất và nước dưới tác động của các tác nhân sinh học có trong tự nhiên, nghĩa là thông qua hoạt động tổng hợp của các tác nhân từ động vật, thực vật đến VSV để làm biến đổi nguồn nước thải

bị nhiễm bẩn bởi các hợp chất hữu cơ và vô cơ. Từ đó tiến tới giảm được các chỉ số COD và BOD của nước thải xuống tới mức cho phép khiến các nguồn nước này có thể sử dụng để tưới cho cây trồng hay dùng để nuôi các loại thủy sản.

Biện pháp xử lý này thường áp dụng đối với các loại nước thải công nghiệp có độ nhiễm bẩn không cao hoặc nước thải sinh hoạt.

Việc xử lý nước thải này được thực hiện bằng các cảnh đồng tưới, bã lọc hoặc hồ sinh học. Diễn biến của quá trình xử lý như sau:

Cho nước thải chảy qua khu ruộng đang canh tác hoặc những cảnh đồng không canh tác được ngăn bờ tạo thành những ô thửa, hay cho chảy vào các ao hồ có sẵn. Nước thải ở trong các thủy vực này sẽ thẩm qua các lớp đất bề mặt, cặn sẽ được giữ lại ở đáy ruộng hay đáy hồ, ao. Trong quá trình tồn lưu nước ở đây, dưới tác dụng của các VSV cùng các loại tảo, thực vật sẽ xảy ra quá trình oxy hóa sinh học, chuyển hóa các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất đơn giản hơn, thậm chí có thể được khoáng hóa hoàn toàn. Như vậy, sự có mặt của oxy không khí trong các mao quản của đất hoặc oxy được thải ra do hoạt động quang hợp của tảo và thực vật sẽ là yếu tố quan trọng cần cho quá trình oxy hóa nguồn nước thải. Càng xuống lớp đất dưới sâu lượng oxy càng ít, vì vậy ảnh hưởng xấu đến quá trình oxy hóa làm cho quá trình oxy hóa nước thải giảm dần. Đến độ sâu nhất định thì chỉ còn nhóm VSV ký khí khử nitrate trong nước thải.

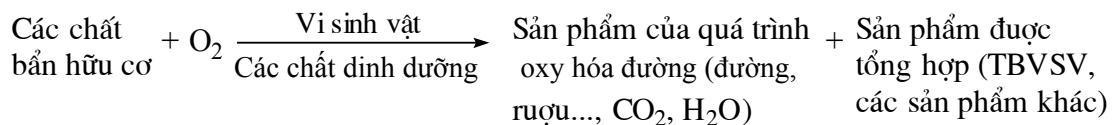
Ở quá trình xử lý này, nguồn nước thải đã qua xử lý được sử dụng tưới cho cây trồng hoặc nuôi trồng thủy sản. Tùy theo phương pháp xử lý khác nhau mà nguồn nước thải sau xử lý được sử dụng khác nhau:

Ví dụ: Nếu xả nước thải ra đồng ruộng hay khu đất ở ngoài đồng, thì sau khi xử lý nguồn nước này thường được sử dụng tưới cho cây trồng, còn nếu xả vào ao, hồ thì sau khi xử lý nước được dùng để nuôi trồng thủy sản (tôm, cá...).

e) *Xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện nhân tạo*

* Xử lý hiếu khí:

Nguyên lý chung của quá trình xử lý sinh học hiếu khí: Khi nước thải tiếp xúc với bùn hoạt tính, các chất thải có trong môi trường như các chất hữu cơ hòa tan, các chất keo và phân tán nhỏ sẽ được chuyển hóa bằng cách hấp thụ và keo tụ sinh học trên bề mặt các tế bào VSV. Tiếp đó là giai đoạn khuếch tán và hấp thụ các chất bẩn từ mặt ngoài của tế bào vào trong tế bào qua màng bán thẩm (màng nguyên sinh), các chất vào trong tế bào dưới tác dụng của hệ enzyme nội bào sẽ được phân hủy. Quá trình phân hủy các chất bẩn hữu cơ xảy ra trong tế bào chất của tế bào sống là các phản ứng oxy hóa khử, có thể biểu diễn ở dạng sau:



* Yếu tố môi trường ảnh hưởng đến quá trình xử lý nước thải:

Để tạo điều kiện cho quá trình xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện hiệu khí cần điều chỉnh các yếu tố môi trường sau:

+ Oxy (O_2): Trong các công trình xử lý hiệu khí O_2 là thành phần cực kỳ quan trọng của môi trường, vì vậy cần đảm bảo đủ O_2 liên tục trong suốt quá trình xử lý nước thải và hàm lượng O_2 hòa tan trong nước ra khỏi bể lắng đạt hai không nhỏ hơn 2 mg/l.

+ Nồng độ các chất bẩn hữu cơ phải thấp hơn ngưỡng cho phép. Nếu nồng độ các chất bẩn hữu cơ vượt quá ngưỡng cho phép sẽ ảnh hưởng xấu đến hoạt động sống của VSV, vì vậy khi đưa nước thải vào các công trình xử lý cần kiểm tra các chỉ số BOD, COD của nước thải. Hai chỉ số này phải có nồng độ nhỏ hơn 500 mg/l. Nếu dùng bể aeroten thì BOD_{tp} (như cầu oxy sinh hóa thành phần) không được quá 1000 mg/l, nếu chỉ số BOD_{tp} vượt quá giới hạn cho phép thì cần lấy nước ít ô nhiễm hoặc không bị ô nhiễm để pha loãng.

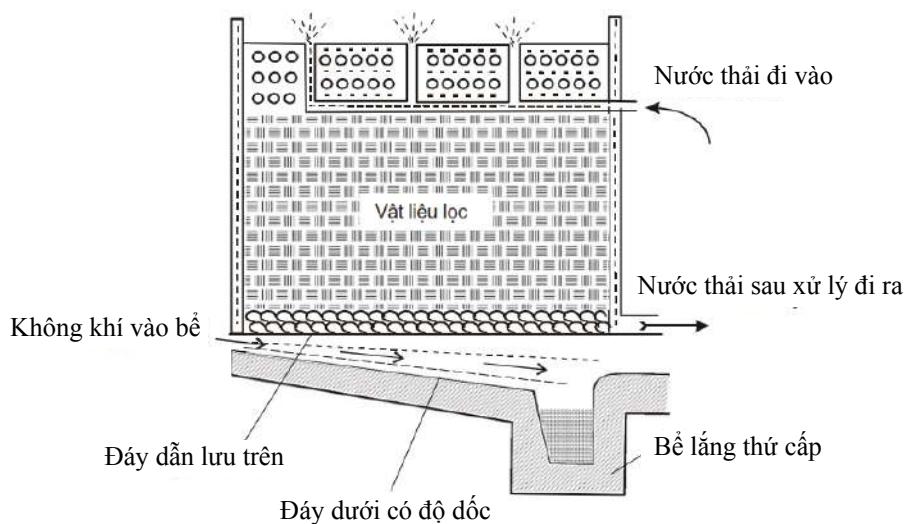
+ Nồng độ các chất dinh dưỡng cho VSV: Để VSV tham gia phân giải nước thải một cách có hiệu quả, cần phải cung cấp cho chúng đầy đủ các chất dinh dưỡng. Lượng chất dinh dưỡng cho VSV không được thấp hơn giá trị trong (bảng 9.3).

Ngoài nguồn nitơ và phosphor có nhu cầu như nêu ở bảng 9.3, các nguyên tố dinh dưỡng khoáng khác như K, Ca, S... thường đã có trong nước thải, do đó không cần phải bổ sung. Nếu thiếu nitơ thì ngoài việc làm chậm quá trình oxy hóa còn làm cho bùn hoạt tính khó lắng và dễ trôi theo nước ra khỏi bể lắng.

Bảng 9.3. Nồng độ các chất dinh dưỡng cho VSV để xử lý nước thải

(theo M.X.Mxitrep, 1982)

<i>BOD_{tp} của nước thải (mg/l)</i>	<i>Nồng độ nitơ trong muối ammonium (mg/l)</i>	<i>Nồng độ phosphor trong P_2O_5 (mg/l)</i>
< 500	15	3
500 – 1000	25	8



Hình 9.5: Bể lọc nước thải sinh học.

Để xác định sơ bộ lượng các chất dinh dưỡng cần thiết đối với nhiều loại nước thải công nghiệp, có thể chọn tỷ lệ sau:

$$\text{BOD}_{\text{tp}} : \text{N} : \text{P} = 100 : 5 : 1$$

Ngoài ra, các yếu tố khác của môi trường xử lý như pH, nhiệt độ cũng ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hoạt động sống của VSV trong các thiết bị xử lý. Thực tế cho thấy pH tối ưu trong bể xử lý hiếu khí là 6,5 – 8,6; nhiệt độ ở 6 – 37 °C.

* Để xử lý nước thải theo biện pháp hiếu khí thường sử dụng hai loại công trình là bể lọc sinh học (biofilter) và bể sục khí (aeroten).

– *Bể lọc sinh học*: Là thiết bị xử lý nước thải dựa trên nguyên tắc lọc với sự tham gia của VSV. Thiết bị này làm bằng bê tông có dạng hình tròn hay hình chữ nhật có hai đáy (hình 9.4). Đáy trên gọi là đáy dẫn lưu, được cấu tạo bằng bê tông cốt thép có lỗ thủng với tổng diện tích lỗ thủng nhỏ hơn 5 – 6% diện tích của đáy. Đáy dưới được xây kín, có độ dốc nhất định để nước dễ dàng chảy về một phía và thông với bể lắng thứ cấp, là nơi chứa nước thải sau khi đã xử lý xong. Ở bể này, nước được lưu lại một thời gian ngắn để lắng cặn trước khi hòa vào hệ thống thoát của cơ sở. Chiều cao của bể lọc hay của cột nguyên liệu sẽ phụ thuộc vào thành phần của nước thải cũng như khả năng oxy hóa của màng sinh vật. Lưu lượng dòng chảy của nước thải phụ thuộc vào khả năng oxy hóa của màng sinh vật.

Để tạo điều kiện hiếu khí cho quá trình xử lý, từ phía dưới của đáy dẫn lưu, người ta cho không khí đi lên qua vật liệu lọc hoặc tấm mang bằng thông khí tự nhiên hay thổi khí bằng quạt.

Vật liệu dùng trong bể lọc là các loại đá cuội, đá dăm và xỉ than đá (theo phương pháp cổ điển). Để tăng diện tích tiếp xúc giữa VSV và nước thải, đồng thời tránh tình trạng tắc nghẽn dòng chảy trong thiết bị lọc sinh học, người ta thay các vật liệu lọc bằng những tấm mang làm bằng vật liệu nhẹ, xốp có cấu tạo dạng ống hoặc dạng miếng, chúng được thiết kế sao cho có nhiều nếp gấp để tăng diện tích bề mặt.

Nước thải có chứa VSV tham gia xử lý được tưới từ trên xuống lớp vật liệu lọc hay tấm mang theo nguyên tắc chênh lệch thể nồng. Khi dòng nước thải chảy qua vật liệu lọc hay tấm mang, VSV sẽ phát triển tạo thành màng sinh vật bám vào khắp bề mặt của nguyên liệu lọc cùng tấm mang và khu trú ở đây. Như vậy, nước thải theo dòng chảy từ trên xuống sẽ tiếp xúc với màng sinh vật. Khi đó sẽ xảy ra quá trình oxy hóa các chất bẩn có trong nước thải, để cuối cùng khi đến bể lắng thứ cấp, nước thải sẽ có chỉ số BOD_5 giảm đi rất nhiều so với nước thải chưa xử lý.

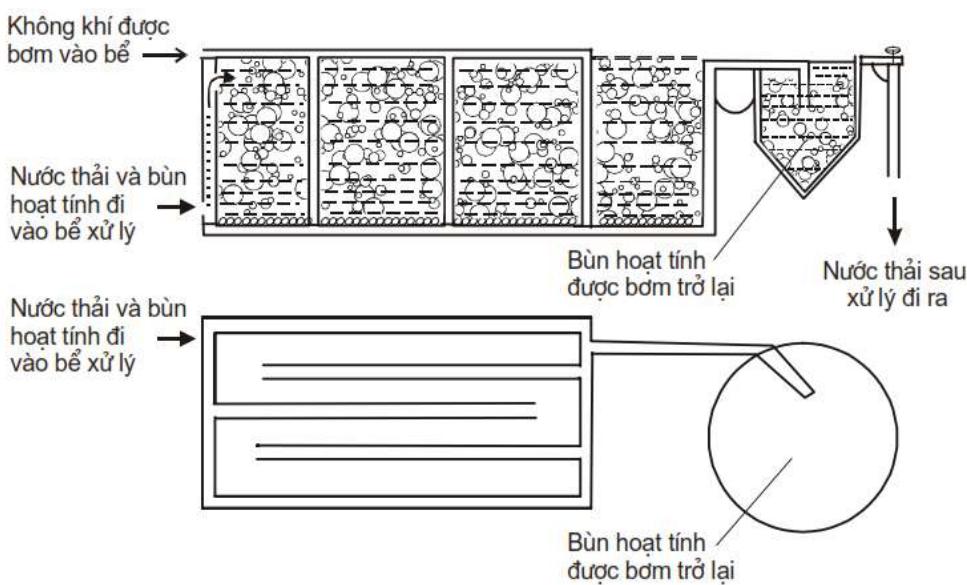
Trong quá trình vận hành của bể lọc sinh vật, sự sinh trưởng và chết của màng sinh vật xảy ra không ngừng. Khi màng sinh vật bị chết sẽ bị tách khỏi nơi bám và bị cuốn theo dòng nước chảy ra khỏi bể lọc, cuối cùng sẽ được lắng đọng ở bể lắng thứ cấp cùng với cặn bùn.

Hiệu quả của hệ thống bể lọc sinh học rất cao, nếu hoạt động tốt có thể làm giảm 90% chỉ số BOD_5 của nước thải.

– **Bể sục khí (Aeroten):** Bể sục khí là hệ thống bể oxy hóa (hình 9.6) có dạng hình chữ nhật được ngăn ra làm nhiều buồng (3 – 4 buồng) nối với bể lắng. Giống như ở bể lọc sinh học, quá trình xử lý nước thải ở bể sục khí được tiến hành nhờ hoạt động của hệ VSV ở bùn hoạt tính. Nhưng quá trình sục khí này được thực hiện trong điều kiện có thông khí mạnh nhờ hệ thống sục khí từ dưới đáy bể lên. Cường độ thông khí $5 \text{ m}^3/\text{m}^2/\text{giờ}$, bảo đảm oxy tối đa cho quá trình oxy hóa. Ở bể oxy hóa, bùn hoạt tính lấy từ bùn gốc sau khi qua giai đoạn khởi động hay lấy từ bể lắng cặn chuyển vào. Ở đây bùn hoạt tính gấp oxy của không khí được bơm vào bể sẽ xảy ra quá trình oxy hóa và khoáng hóa các chất bẩn trong nước thải một cách khá triệt để. Sau khi chảy suốt qua các buồng của bể oxy hóa, nước thải sẽ chảy vào bể lắng. Ở đây cũng xảy ra quá trình lắng cặn xuống đáy bể, phần nước ở trên là nước đã được xử lý sẽ được dẫn ra ngoài. Trong quá trình vận hành, ở bể oxy hóa, theo thời gian lượng bùn hoạt tính sẽ tăng lên, đồng thời cũng tích lũy nhiều té bào VSV già cỗi khiến hoạt tính của bùn giảm – “bùn bị già”. Vì vậy, khi cho bùn hoạt tính thu ở bể lắng trở lại bể oxy hóa, không nhất thiết cho toàn bộ số bùn có trong bể lắng mà chỉ cho một phần để đảm bảo nồng độ bùn hoạt tính là $2 - 4 \text{ g/l}$.

Xử lý nước thải bằng bể aeroten phức tạp hơn và đòi hỏi nhiều công sức hơn so với ở bể lọc sinh học. Người ta phải theo dõi liên tục để kịp thời điều chỉnh các chỉ số sau:

- Nồng độ bùn hoạt tính.
- Chế độ thông khí.
- Nồng độ các chất bẩn trong nước thải.
- Nồng độ các chất dinh dưỡng cho VSV.



Hình 9.6. Bể sục khí.

+ Xử lý khí:

Quy trình xử lý nước thải bằng biện pháp sinh học trong điều kiện khí là quy trình phân hủy sinh học khí các hợp chất hữu cơ chứa trong nước thải để tạo thành khí CH₄ và các sản phẩm vô cơ kể cả CO₂, NH₃.

Quy trình này có những ưu điểm sau:

– Nhu cầu về năng lượng không nhiều.

– Ngoài vai trò xử lý nước thải, bảo vệ môi trường, quy trình còn tạo được nguồn năng lượng mới là khí sinh học, trong đó CH₄ chiếm tỷ lệ 70 – 75%.

– Cũng như xử lý sinh học hiếu khí, ở quy trình này bùn hoạt tính được sử dụng làm tác nhân gây biến đổi thành phần của nước thải. Bùn hoạt tính được sử dụng ở đây có lượng dư thấp, có tính ổn định khá cao, để duy trì hoạt động của bùn không đòi hỏi cung cấp nhiều chất dinh dưỡng, bùn có thể tồn trữ trong thời gian dài.

– Về mặt thiết bị: công trình có cấu tạo khá đơn giản, có thể làm bằng vật liệu tại chỗ với giá thành không cao.

Bên cạnh những ưu điểm trên, biện pháp xử lý sinh học khí còn bộc lộ những tồn tại sau:

– Quy trình nhạy cảm với các chất độc hại, với sự thay đổi bất thường về tải trọng của công trình, vì vậy khi sử dụng cần có sự theo dõi sát sao các yếu tố của môi trường.

– Xử lý nước thải chưa triệt để nên bước cuối cùng phải xử lý hiếu khí. Cho tới nay, những công trình nghiên cứu xử lý khí còn ít, thiếu những hiểu biết về VSV tham gia vào quy trình khí này. Hiện nay, biện pháp này hẵn còn ở quy mô Pilot có thể tích 6 m³, 30 m³, 200 m³... cho đến quy mô lớn. Đến nay trên thế giới đã có trên vài chục nhà máy xử lý nước thải theo kiểu này, nhất là ở Hà Lan, Hoa Kỳ, Thụy Sỹ, Cộng hòa Liên bang Đức.

* Các quá trình chuyển hóa chủ yếu trong điều kiện khí:

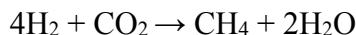
+ Quá trình thủy phân (hydrolysis): Muốn hấp thụ được các chất hữu cơ trong nước thải, VSV phải thực hiện các công đoạn chuyển hóa các chất này. Việc đầu tiên là phải thủy phân các chất có phân tử lượng cao thành các polymer có phân tử lượng thấp và monomer để có khả năng hấp thụ qua màng tế bào VSV. Để thực hiện quá trình thủy phân, các VSV phải tiết ra các enzyme như proteinase, lipase, cellulase... Sau thủy phân, các sản phẩm sẽ được tạo thành như các amino acid, đường, rượu, các acid béo mạch dài...

Quá trình thủy phân xảy ra khá chậm, phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nhiệt độ, pH, cấu trúc của các chất hữu cơ cần phân giải.

+ Quá trình acid hóa (Acidosis): Các sản phẩm của quá trình thủy phân sẽ được tiếp tục phân giải dưới tác động của VSV lên men acid để tạo thành acid béo dễ bay hơi như acid acetic, acid formic, acid propionic. Ngoài ra còn có một số dạng khác như rượu, methanol, ethanol, acetone, NH₃, CO₂.

+ Quá trình acetate hóa (Acetogenesis): Các acid là sản phẩm của quá trình trên lại được tiếp tục thủy phân để tạo lượng acid acetic cao hơn. Sản phẩm của quá trình phụ

thuộc vào áp suất riêng phần của H₂ trong môi trường. Áp suất riêng phần của H₂ được giữ < 10³ atm để VSV có thể biến đổi H₂ thành CH₄ theo phản ứng sau:



Thực tế cho thấy khi áp suất riêng phần của H₂ lớn thì sản phẩm của quá trình này chứa nhiều acid béo trung gian như acid propionic, acid butyric... Do vậy làm chậm quá trình tạo methane.

+ Quá trình methane hóa (Methangensis): Đó là giai đoạn cuối cùng của quá trình phân hủy các sản phẩm hữu cơ đơn giản của các giai đoạn trước để tạo CH₄, CO₂ nhờ các vi khuẩn lên men methane. Gồm có hai nhóm sau:

– Nhóm biến đổi acetate: Nhóm này có tốc độ phát triển chậm, đòi hỏi công trình phải lưu các chất thải trong thời gian dài.

– Nhóm biến đổi hydro: Nhóm này có tốc độ phát triển nhanh hơn nhiều, do đó có khả năng giữ áp suất riêng phần của H₂ thấp, tạo điều kiện tốt cho quá trình biến đổi acetate từ các acid béo.

* Yếu tố ảnh hưởng đến quá trình phân hủy khí:

– *Oxy*: Trong xử lý nước thải khí oxy được coi là độc tố đối với VSV. Do đó lý tưởng nhất là tạo điều kiện khí tuyệt đối trong bể xử lý.

– *Chất dinh dưỡng*: Chất dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình phát triển, sinh trưởng của VSV, liên quan trực tiếp đến quá trình phân hủy các hợp chất hữu cơ trong nước thải. Cũng như các VSV khác, VSV khí đòi hỏi các chất dinh dưỡng chính bao gồm các hợp chất carbon, nitơ, phosphate... để hình thành các enzyme thực hiện quá trình phân hủy các hợp chất trong nước thải. Việc cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết sẽ tạo cho bùn có tính lắng tốt và hoạt tính cao, hoạt động tốt trong quá trình xử lý.

– *Nhiệt độ*: Nhóm VSV khí có ba vùng nhiệt độ thích hợp cho sự phân hủy các hợp chất hữu cơ và ở mỗi nhiệt độ thích hợp cho một nhóm VSV khí khác nhau.

+ Vùng nhiệt độ cao: 45 – 65 °C.

+ Vùng nhiệt độ trung bình: 20 – 45 °C.

+ Vùng nhiệt độ thấp: < 20 °C.

Hai vùng nhiệt độ đầu thích hợp cho nhóm VSV lên men methane, ở vùng nhiệt độ này lượng methane được tạo thành cao. Đối với vùng nhiệt độ cao, để duy trì nhiệt độ này cần phải cung cấp thêm năng lượng, điều này sẽ gây tổn kém cho quá trình sản xuất, tính hiệu quả kinh tế của công trình sẽ bị hạn chế.

Ở nước ta, nhiệt độ trung bình từ 20 – 32 °C thích hợp cho nhóm VSV ở vùng nhiệt độ trung bình phát triển.

– *pH*: Trong quy trình xử lý khí, pH của môi trường ảnh hưởng đến tốc độ phân hủy các chất hữu cơ, cụ thể là ảnh hưởng đến bốn quá trình chuyển hóa cơ bản của sự phân hủy khí.

Ở quá trình xử lý, người ta nhận thấy các quá trình chuyển hóa cơ bản chịu ảnh hưởng trực tiếp lẫn nhau, khi một trong các quá trình này bị cản trở hoặc thúc đẩy sẽ ảnh hưởng đến quá trình xảy ra tiếp theo, do đó sẽ làm tốc độ phân hủy các chất xảy ra chậm lại hoặc nhanh hơn. Ví dụ: khi nhiệt độ thay đổi hoặc khi thành phần nước thải thay đổi (do có sự nạp mới vào công trình), thì nhóm VSV acid hóa thích nghi hơn so với nhóm VSV sinh methane. Khi pH giảm mạnh ($\text{pH} < 6$) sẽ làm giảm quá trình sinh khí CH_4 . Hơn nữa khi pH giảm, các acid trung gian tích lũy nhiều, làm các phản ứng phân hủy khó thực hiện và dẫn đến dừng quá trình acetate hóa... pH tối ưu trong quá trình phân hủy khí là $6,5 - 8,5$.

– *Các độc tố:* Qua tìm hiểu đặc tính sinh lý của các VSV tham gia xử lý nước thải bằng phương pháp khí khí, người ta thấy:

+ Một số hợp chất như CCl_4 , CHCl_3 , CH_2Cl_2 ... và các ion tự do của các kim loại nặng có nồng độ 1 mg/l sẽ thể hiện tính độc đối với các VSV khí khí.

+ Các hợp chất như formaldehyde, SO_2 , H_2S với nồng độ $50 - 400 \text{ mg/l}$ sẽ gây độc hại với VSV khí khí trong công trình xử lý.

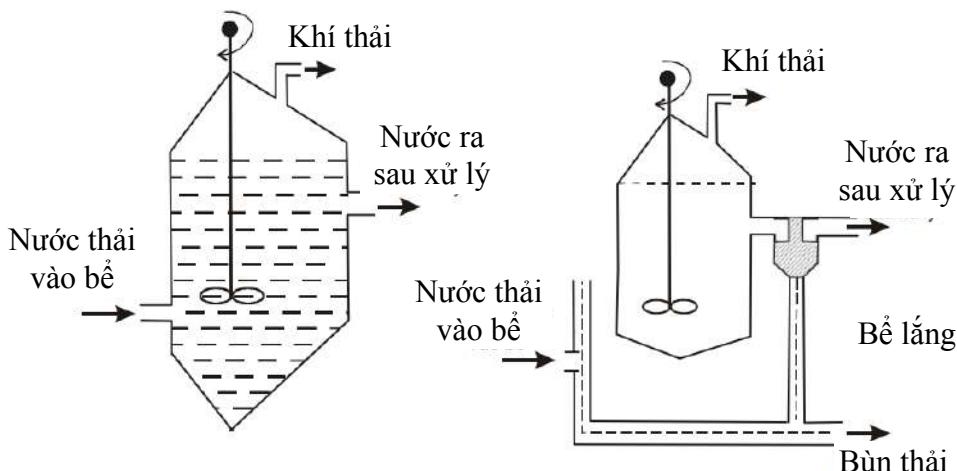
+ S^{2-} được coi là tác nhân úc chế quá trình tạo methane. Do S^{2-} làm kết tủa các nguyên tố vi lượng như Fe, Ni, Co, Mo... cho nên hạn chế sự phát triển của VSV.

* Các dạng công trình xử lý khí khí:

– *Bể tự hoại* là loại công trình xử lý nước thải loại nhỏ dùng cho từng hộ gia đình. Loại công trình này thực hiện hai chức năng: lắng và chuyển hóa cặn lắng của nước thải (chủ yếu là nước thải từ các nhà vệ sinh) bằng quá trình phân giải khí khí.

– *Bể lắng hai vỏ*: có nguyên tắc hoạt động và thực hiện hai chức năng tương tự như bể tự hoại nhưng ở quy mô lớn hơn, công suất xử lý nước thải lớn hơn.

– *Bể methane cổ điển*: Bể này được ứng dụng để xử lý cặn lắng (từ bể lắng) và bùn hoạt tính dư của trạm xử lý nước thải. Hầu hết các trạm xử lý nước thải thành phố đều áp dụng kiểu bể này (hình 9.7).

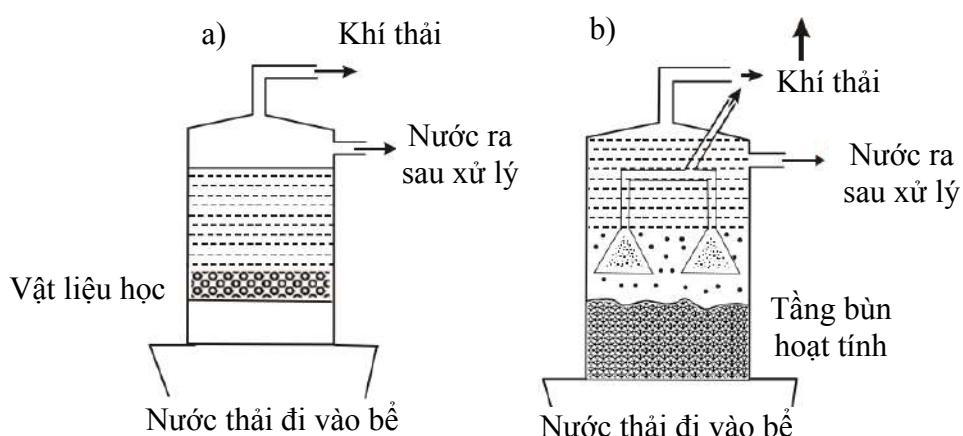


Hình 9.7. Bể lọc methane cổ điển.

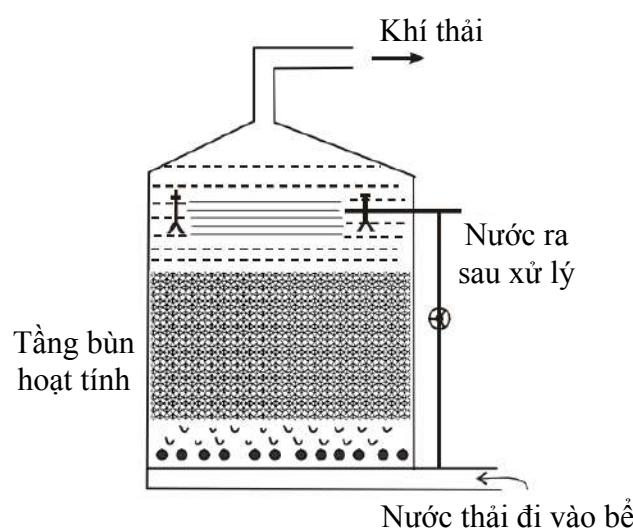
Nguyên tắc loại hình này là quá trình xử lý nước thải qua vật liệu lọc để vi sinh vật ky khí dính bám vào và thực hiện quá trình chuyển hóa sinh hóa các hợp chất hữu cơ chứa trong nước thải, đồng thời tránh được sự rửa trôi của màng VSV (hình 9.8).

Loại công trình này không có vật liệu đỡ (vật liệu lọc) như ở bể lọc ky khí AF. Ở đây các VSV ky khí liên kết và tập hợp lại thành đám lớn dạng hạt và có vai trò chủ yếu để chuyển hóa các hợp chất hữu cơ. Chúng đủ nặng để tránh hiện tượng rửa trôi ra khỏi công trình. Bể UASB có cấu tạo gồm hai ngăn: ngăn lắng và ngăn phân hủy. Bằng biện pháp thiết kế khá đặc biệt của ngăn lắng cùng với tính lắng cao của bùn hoạt tính đã giải quyết được vấn đề lưu lại nồng độ sinh khối bùn cao trong bể và giảm được thời gian lưu nước.

+ Ngoài các công trình xử lý nước thải được nêu trên, người ta còn phối kết hợp giữa công trình UASB với công trình AF (hình 9.9) và nhiều công trình khác, như xây dựng công trình xử lý nước thải qua hình chụp phương pháp hiếu khí; xây dựng công trình xử lý nước thải qua các hình chụp bằng phương pháp xây bể chìm dưới đất...



Hình 9.8. Bể lọc ky khí AF.



Hình 9.9. Công trình phối kết hợp giữa UASB và AF (phải).

9.4.2. Xử lý chất thải rắn bằng phương pháp sinh học

9.4.2.1. Phân loại và xử lý chất thải rắn sinh hoạt trên thế giới

Công nghệ xử lý CTR trên thế giới hiện nay có rất nhiều phương pháp, trong đó các phương pháp truyền thống vẫn tiếp tục được sử dụng như:

- Công nghệ chôn lấp chất thải.
- Công nghệ thiêu đốt.

Những năm gần đây, công nghệ phân loại rác tại nguồn và chế biến rác thải hữu cơ làm phân compost (phân ủ) phát triển rất mạnh. Đây là công nghệ phổ biến nhất trên thế giới hiện nay, nhằm tái chế, tái sử dụng chất thải, góp phần giảm thiểu lượng phát sinh chất thải rắn và bảo vệ MT.

Những bài học về thu gom và xử lý CTR trên thế giới có rất nhiều. Ví dụ: ở châu Âu, nhiều quốc gia đã thực hiện quản lý chất thải thông qua phân loại chất thải rắn tại nguồn và xử lý tốt, đạt hiệu quả cao về kinh tế và MT. Tại các quốc gia như Đan Mạch, Anh, Hà Lan, Đức, việc quản lý chất thải được thực hiện rất chặt chẽ, công tác phân loại và thu gom rác đã trở thành nề nếp và người dân chấp hành rất nghiêm quy định này. Các loại rác thải có thể tái chế được như giấy loại, chai lọ thuỷ tinh, vỏ đồ hộp... được thu gom vào các thùng chứa riêng. Đặc biệt rác thải nhà bếp có thành phần hữu cơ dễ phân huỷ được yêu cầu phân loại riêng đựng vào các túi có màu sắc theo đúng quy định thu gom hàng ngày để đưa đến nhà máy chế biến phân compost (phân ủ). Đối với các loại rác bao bì có thể tái chế, người dân mang đến thùng rác đặt cố định trong khu dân cư.

Ở Nhật Bản, trong 37 Đạo luật về bảo vệ MT có 7 Đạo luật về quản lý và tái chế CTR. Việc phân loại rác tại nguồn đã được triển khai từ những năm 1970. Tỷ lệ tái chế CTR ở Nhật Bản đạt rất cao. Hiện nay tại các thành phố của Nhật chủ yếu sử dụng công nghệ đốt để xử lý phần rác khó phân huỷ. Các hộ gia đình được yêu cầu phân loại rác thành ba dòng:

- Rác hữu cơ dễ phân huỷ để làm phân hữu cơ vi sinh, được thu gom hàng ngày đưa đến nhà máy chế biến.

- Rác vô cơ gồm các loại vỏ chai, hộp đưa đến nhà máy để phân loại, tái chế.

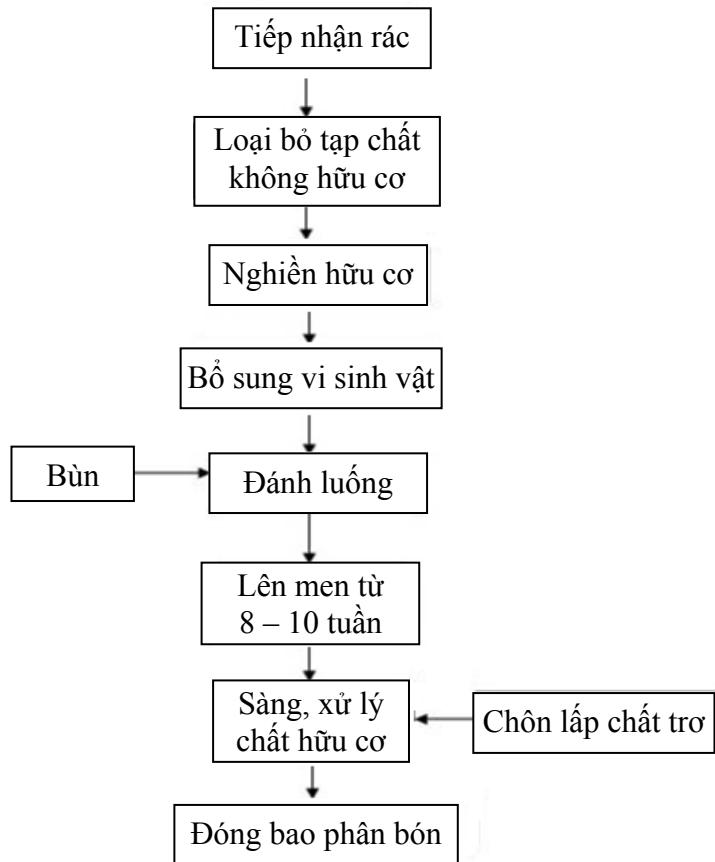
- Loại rác khó tái chế, hiệu quả không cao nhưng cháy được sẽ đưa đến nhà máy đốt rác thu hồi năng lượng. Các loại rác này được yêu cầu đựng riêng trong những túi có màu sắc khác nhau và các hộ gia đình tự mang ra điểm tập kết rác của cụm dân cư vào các giờ quy định dưới sự giám sát của đại diện cụm dân cư.

Ở Hàn Quốc, cách quản lý chất thải giống với Nhật Bản, nhưng cách xử lý lại giống ở Đức. Rác hữu cơ nhà bếp một phần được sử dụng làm giá thể nuôi trồng nấm thực phẩm, phần lớn hơn được chôn lấp có kiểm soát để thu hồi khí biogas cung cấp cho phát điện. Sau khi rác tại hố chôn phân huỷ hết, tiến hành khai thác mùn ở bãi chôn làm phân bón. Như vậy, tại các nước phát triển, việc phân loại rác tại nguồn đã được tiến hành cách đây khoảng 30 năm và đến nay cơ bản đã thành công trong việc tách rác thành hai dòng hữu cơ dễ phân huỷ được thu gom xử lý hàng ngày, rác khó phân huỷ có thể tái chế hoặc đốt, chôn lấp an toàn và được thu gom hàng tuần.

Tại Đông Nam Á, Singapore đã thành công trong quản lý CTR để bảo vệ MT. Chính phủ Singapore đang yêu cầu tăng tỷ lệ tái chế thông qua phân loại rác tại nguồn từ các hộ gia đình, các chợ, các cơ sở kinh doanh để giảm chi ngân sách cho Nhà nước. Các quốc gia còn lại đang trong quá trình tìm kiếm hoặc triển khai mới mô hình quản lý CTR. Tại Bangkok, việc phân loại rác tại nguồn chỉ mới thực hiện được tại một số trường học và một số quận trung tâm để tách ra một số loại bao bì dễ tái chế, lượng rác còn lại vẫn đang phải chôn lấp, tuy nhiên được ép chặt để giảm thể tích và cuộn nilon rất kỹ xung quanh mỗi khối rác nhằm giảm bớt ô nhiễm. Một số công nghệ tái chế rác thải làm phân bón ở các nước như sau:

9.4.2.2. Công nghệ xử lý rác thải sinh hoạt của Mỹ – Canada

a) *Nội dung công nghệ*: Ở các vùng của Mỹ và Canada có khí hậu ôn đới thường áp dụng phương pháp xử lý rác thải ủ đồng tĩnh có đảo trộn như sau: Rác thải được tiếp nhận và tiến hành phân loại. Rác thải hữu cơ được nghiền và bổ sung vi sinh vật, trộn với bùn và đánh đồng ở ngoài trời. Chất thải được lên men từ 8 – 10 tuần lễ, sau đó sàng lọc và đóng bao (hình 9.10).



Hình 9.10. Sơ đồ công nghệ xử lý rác thải của Mỹ – Canada.

(Diễn đàn môi trường, Lê Văn Khoa, 2010).

b) *Ưu điểm*: (1) Thu hồi được sản phẩm làm phân bón; (2) Tận dụng được nguồn bùn là các phế thải của thành phố hoặc bùn ao; (3) Cung cấp được nguyên liệu tái chế cho các ngành công nghiệp và (4) Kinh phí đầu tư và duy trì thấp.

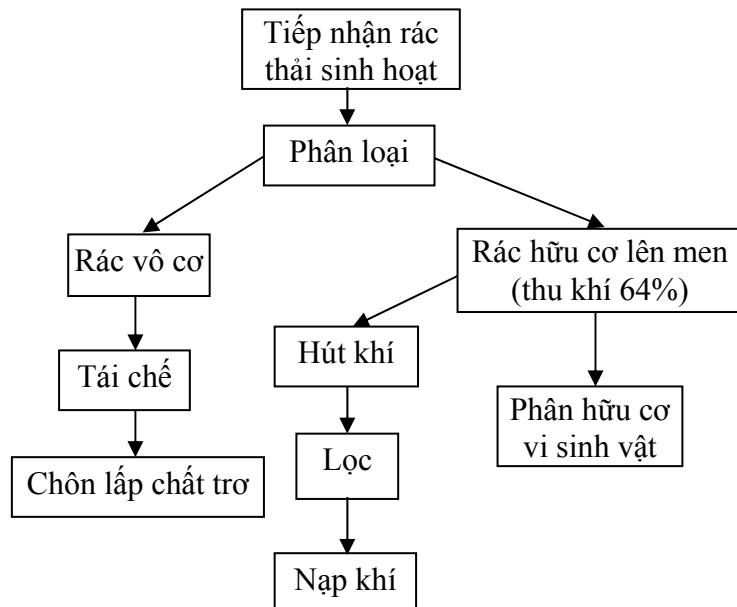
c) *Hạn chế*: (1) Hiệu quả phân huỷ hữu cơ không cao; (2) Chất lượng phân bón được thu hồi không cao vì có lẫn các kim loại nặng trong bùn thải hoặc bùn ao; (3) Không phù hợp với khí hậu nhiệt đới tại Việt Nam vì phát sinh nước rỉ rác, không đảm bảo được vệ sinh MT, ảnh hưởng đến nguồn nước mặt và nước ngầm; (4) Diện tích đất sử dụng quá lớn.

9.4.2.3. Công nghệ xử lý rác làm phân bón của Đức

a) *Nội dung công nghệ*: Công nghệ phổ biến nhất của Đức là xử lý rác đi đôi với thu hồi khí sinh học và phân bón hữu cơ vi sinh. Cụ thể như sau: Rác thải ở các gia đình đã được phân loại, ở những nơi công cộng phân loại chưa triệt để, được tiếp nhận và tiến hành phân loại tiếp. Rác hữu cơ được đưa vào các thiết bị ủ kín dưới dạng các thùng chịu áp lực cùng với thiết bị thu hồi khí sinh ra trong quá trình lên men phân giải hữu cơ (hình 9.11).

b) *Ưu điểm*: (1) Xử lý triệt để, đảm bảo vệ sinh MT; (2) Thu hồi sản phẩm là khí đốt có giá trị cao, phục vụ cho các ngành công nghiệp ở khu lân cận nhà máy; (3) Thu hồi phân bón có tác dụng cải tạo đất; (4) Cung cấp nguyên liệu tái chế cho các ngành công nghiệp.

c) *Hạn chế*: Đòi hỏi kinh phí đầu tư lớn và kinh phí duy trì cao. Chất lượng phân bón thu hồi không cao.



Hình 9.11. Sơ đồ dây chuyền công nghệ xử lý rác thải sinh hoạt của CHLB Đức.

(Diễn đàn môi trường, Lê Văn Khoa, 2010).

9.4.2.4. Sản xuất phân hữu cơ (compost) ở Việt Nam

a) Khái niệm

Ủ sinh học (compost) có thể được coi là quá trình ổn định sinh hóa các chất hữu cơ để thành các chất mùn với thao tác và kiểm soát một cách khoa học tạo môi trường tối ưu cho quá trình.

b) Ưu điểm của phương pháp làm phân hữu cơ

- Giảm lượng chất thải phát sinh (khoảng 50% lượng chất thải sinh hoạt).
- Tạo ra sản phẩm phân hữu cơ phục vụ cho trồng trọt (thay thế một phần cho phân hóa học, tạo độ xốp cho đất, sử dụng an toàn, dễ dàng).
- Góp phần cải tạo đất (giúp tăng độ mùn, tơi xốp của đất).
- Tiết kiệm bã chôn lấp, giảm ảnh hưởng gây ô nhiễm môi trường của chất thải rắn.
- Vận hành đơn giản, dễ bảo trì và kiểm soát chất lượng sản phẩm.
- Giá thành để xử lý tương đối thấp.

c) Nhược điểm

- Yêu cầu diện tích đất để xây dựng nhà xưởng lớn.
- Chất lượng sản phẩm chưa cao, chưa ổn định.
- Gặp khó khăn khi tiêu thụ sản phẩm.
- Mức độ tự động hóa của công nghệ không cao.
- Việc phân loại còn mang tính thủ công nên thường ảnh hưởng đến sức khoẻ của công nhân làm việc.
- Nạp nguyên liệu thủ công do vậy công suất thấp.

Yêu cầu những chất thải có hàm lượng hữu cơ dễ phân hủy sinh học lớn hơn 50% và xu hướng sử dụng phân hữu cơ được nhiều nơi chấp nhận, nhiều đô thị xây dựng nhà máy.

d) Những yếu tố ảnh hưởng tới quá trình làm phân hữu cơ

– Vi sinh vật

Vi sinh vật theo nhiệt độ được phân thành ba nhóm:

- + Nhóm VSV ưa lạnh: $-10 \rightarrow 20^{\circ}\text{C}$ (15°C).
- + Nhóm VSV ưa ấm: $20 \rightarrow 50^{\circ}\text{C}$ (35°C).
- + Nhóm VSV ưa nóng $45 \rightarrow 75^{\circ}\text{C}$ (55°C).

Đối với quá trình phân hủy chất hữu cơ trong sản xuất phân hữu cơ, hai nhóm sinh vật ưa ấm và ưa nóng chiếm ưu thế. Tuy nhiên, những VSV này vốn tồn tại sẵn trong môi trường tự nhiên, chúng ta chỉ tạo điều kiện thuận lợi nhất để nhóm sinh vật này sinh trưởng, phát triển.

- Kích cỡ

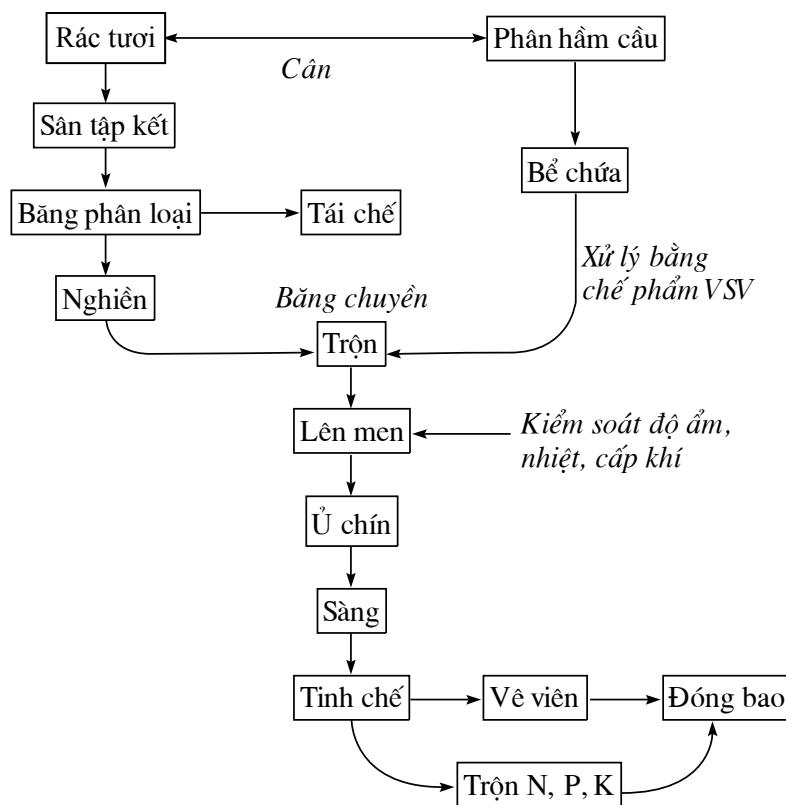
Kích cỡ của rác thải thường không đồng nhất, như vậy không có lợi cho quá trình phân hủy rác thải, do đó chúng ta phải cắt để rác có kích cỡ theo yêu cầu nhằm đạt được hiệu quả cao, tốt nhất là vào khoảng 5 cm.

- Tỷ lệ C/N

Tỷ lệ C/N là một yếu tố cần chú ý đối với quá trình sản xuất phân hữu cơ, xác định nguồn dinh dưỡng cung cấp cho VSV trong quá trình ủ. Giới hạn này có tỷ lệ tốt nhất là vào khoảng từ 20 – 25/1 (trong đó bùn thường có tỷ lệ thấp, các chất thải vườn có tỷ lệ khá cao).

- Độ ẩm

Độ ẩm là một trong những nhân tố quan trọng cần phải xem xét trong quá trình ủ sinh học, độ ẩm thuận lợi nhất cho quá trình phân hủy sinh học từ 50 – 60%. Độ ẩm có thể được điều chỉnh bằng cách trộn thêm các thành phần khô hoặc nước (nước bùn, phân hầm cầu). Khi độ ẩm thấp hơn 40%, khả năng phân hủy sinh học sẽ chậm đi nhưng độ ẩm quá cao sẽ ảnh hưởng đến quá trình lưu thông trao đổi khí trong các đống ủ.



Hình 9.12. Sơ đồ công nghệ làm phân hữu cơ vi sinh.

- Nhiệt độ

Hệ thống phân hủy sinh học hiệu khí được phân hủy bởi các nhóm sinh vật ưa nhiệt trung bình ($30 - 38^{\circ}\text{C}$) và nhóm ưa nhiệt cao ($55 - 60^{\circ}\text{C}$). Trong quá trình theo dõi các hoạt động ủ rác sinh học đã phát sinh các phản ứng tỏa nhiệt liên quan đến quá trình hô hấp trao đổi chất. Nhiệt độ của các đồng ủ có thể được điều chỉnh bởi các dòng khí lưu thông. Trong ủ rơm rạ có thể điều chỉnh gián tiếp bằng cách đảo trộn. Nhìn chung, sau quá trình trộn nhiệt độ giảm xuống $5 - 10^{\circ}\text{C}$, nhưng nhiệt độ sẽ tăng trở lại tới nhiệt độ ban đầu sau vài giờ đồng hồ. Nhiệt độ trong đồng ủ sẽ giảm sâu dần sau khi đồng ủ chín.

- pH

pH là một yếu quan trọng trong quá trình ủ, việc điều chỉnh pH nhằm tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình ủ. Giá trị pH biến động rất lớn trong suốt thời gian ủ.

Giá trị khởi đầu của các thành phần hữu cơ trong rác đặc trưng pH từ 5 – 7, những ngày đầu theo giá trị $\text{pH} \leq 5$. Giai đoạn này sinh khói chất hữu cơ tích lũy nhiệt, nhóm sinh vật ưa nhiệt trung bình sẵn có trong rác thải bắt đầu phát triển và nhiệt độ tăng lên nhanh chóng (sau khoảng 3 ngày) và đạt nhiệt độ cao, lúc này pH tăng lên $8 - 8,5$. Sau đó quá trình ủ phân chín, nhiệt độ giảm dần và pH giảm xuống $7 - 8$. Nếu pH giảm xuống nhỏ hơn 4 thì quá trình ủ thất bại.

- Các mầm bệnh

Sự tiêu diệt các mầm bệnh của các sinh vật rất quan trọng trong khi thiết kế các thành phần trong quá trình ủ sinh học, nó sẽ chịu ảnh hưởng của nhiệt độ và quá trình hiệu khí. Ví dụ, loài *Salmonella* có thể bị phân hủy trong $15 - 20$ phút ở nhiệt độ 60°C , hoặc trong 1 giờ ở nhiệt độ 55°C . Hầu hết các sinh vật gây bệnh đều chết nhanh chóng khi nhiệt độ đạt đến 55°C , chỉ có một số loài sống sót ở nhiệt độ trên 67°C trong thời gian ngắn.

Quá trình sản xuất phân hữu cơ từ rác thải hữu cơ được minh họa theo các bước sau:

Rác hữu cơ → cân → bãitậpkết → dùng cẩu, băng chuyền → băng tải phân loại thủ công → sàng quay → máy tách từ (thu kim loại) → băng tải → (thêm nước vào) nhà ủ phân (VSV) sau đó điều chỉnh độ ẩm trong vòng khoảng $50 - 60\%$, nhiệt độ nhỏ hơn hoặc bằng 55°C , thời gian trong vòng 21 ngày.

9.5. PHÁT TRIỂN CÁC QUÁ TRÌNH XỬ LÝ CHẤT THẢI THÂN THIỆN VỚI MÔI TRƯỜNG

9.5.1. Phát triển và thiết kế các nồi phản ứng sinh học (Bioreactor)

Hiện nay việc xử lý nước thải của các nhà máy còn nhiều bất cập như tính kinh tế, thời gian và tiêu thụ năng lượng không thích hợp... Cần thiết phải có các đề án thiết kế tương thích, bằng cách sử dụng các mẫu động lực học như các nồi phản ứng sinh học (Bioreactor) như solid-state fixed bed bioreactor và solid-state bioreactors với các nồi phản ứng sinh học ở trạng thái sền sệt và thông gió tự nhiên. Các nghiên cứu trong tương lai có thể tạo ra các nồi sinh học hiệu quả, tiết kiệm thời gian và kinh tế hơn.

9.5.2. Quản lý chất thải tích hợp (integrates waste management)

Quản lý chất thải tích hợp là cách tiếp cận mới nhằm quản lý chất thải rắn và chất thải lỏng ở thành phố từ cách nhìn về nguồn chất thải. Nó liên quan đến sự tích hợp các phương pháp xử lý chất thải khác nhau để xử lý chất thải như xử lý chất thải hiếu khí, khí và các hố chôn rác thải. Các nghiên cứu mới cần thiết để tạo ra hệ thống đầy đủ và hiệu quả hơn.

9.5.3. Ứng dụng công nghệ vi sinh vật xử lý chất thải

Ứng dụng công nghệ vi sinh vật xử lý chất thải là một trong những hướng phát triển ưu tiên hàng đầu, trong đó chú trọng sử dụng các công nghệ sạch tạo đà cho việc phát triển bền vững.

Các quá trình xử lý chất thải bằng biện pháp sinh học với vai trò chính là sự đóng góp của các loài VSV nhằm bảo vệ các giá trị của môi trường thiên nhiên.

Công nghệ phân hủy chất thải bằng vi sinh vật dựa trên cơ sở loại bỏ hỗn hợp nhiều chất có trong chất thải và tái sử dụng chúng. Ứng dụng công nghệ vi sinh vật xử lý chất thải sẽ tăng cường khả năng phân hủy các chất, giảm thời gian phân hủy dẫn đến giảm giá thành sản phẩm.

Tóm lại, công nghệ vi sinh vật xử lý chất thải là sự phát triển của công nghệ sinh học nhằm ứng dụng vi sinh vật và các cấu phần của tế bào vi sinh vật để sản xuất các chế phẩm mới có giá trị và ứng dụng các quá trình công nghệ mới, thích hợp trong bảo vệ và phục hồi chất lượng môi trường sống của con người.

Trong thời gian tới, để ứng dụng công nghệ vi sinh vật xử lý rác thải, cần tiếp tục đi sâu nghiên cứu, phân lập, chọn lọc và nuôi cấy các giống vi sinh vật có hoạt tính phân giải rác thải cao. Ứng dụng công nghệ vi sinh sản xuất các chế phẩm sinh học xử lý rác thải hiệu quả và giá thành hợp lý. Cải tiến những công nghệ xử lý rác thải có ứng dụng vi sinh vật và tìm ra những phương pháp xử lý rác thải mới ứng dụng công nghệ vi sinh thay thế những công nghệ truyền thống. Xây dựng, nâng cấp và mở rộng về quy mô lẫn số lượng các nhà máy đáp ứng nhu cầu xử lý rác thải.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Rác thải thường xuyên được phát thải ra môi trường với số lượng ngày càng nhiều, ở đô thị nhiều hơn vùng nông thôn. Xử lý rác để không gây ô nhiễm môi trường, bảo vệ môi trường sống xung quanh, bảo vệ sức khỏe của cộng đồng dân cư là vấn đề cần được giải quyết.

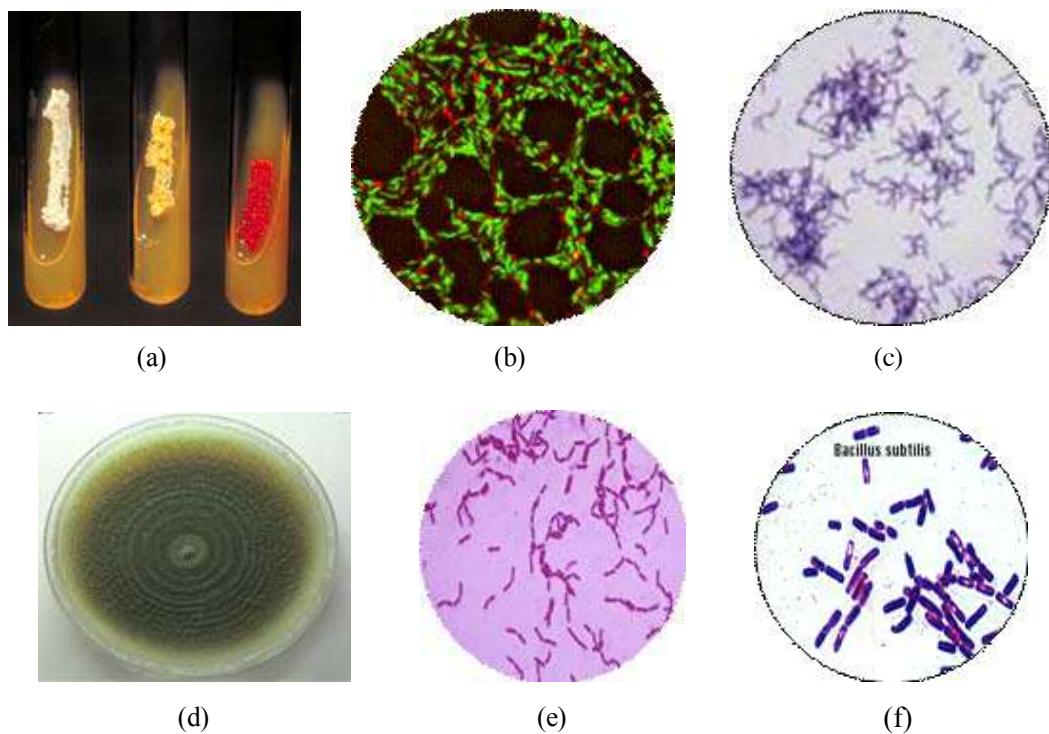
Rác thải sinh hoạt và phế thải, rác thải rắn và nước thải là một thảm họa khó lường trong sự phát triển mạnh mẽ của quá trình sản xuất và đời sống. Chúng không những gây ô nhiễm môi trường sinh thái, ô nhiễm nguồn nước, ô nhiễm đất, gây độc hại đến sức khỏe con người, vật nuôi và cây trồng, mà còn làm mất đi cảnh quan văn hóa.

Tùy từng loại rác thải, phế thải khác nhau mà thành phần, mức độ ô nhiễm khác nhau, nhất là các nguyên tố kim loại nặng như Cd, As, Pb, Co, Hg... và chứa nhiều VSV gây bệnh như thương hàn, dịch hạch, dịch tả...

Sử dụng VSV để xử lý chất thải loại bỏ chất ô nhiễm dựa trên quan niệm rằng tất cả các VSV (chủ yếu là vi khuẩn, xạ khuẩn, vi nấm...) có thể chuyển hóa và/hoặc loại bỏ cơ chất từ môi trường nhằm phục vụ cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng.

Công nghệ vi sinh xử lý rác thải không gây ô nhiễm môi trường đã được ứng dụng nhiều trên thế giới như Mỹ, Canada, Pháp... và tại Việt Nam hiện cũng có nhiều công trình nghiên cứu có ý nghĩa đã được áp dụng thành công, không những xử lý rác mà còn tạo ra nguồn phân bón sinh học, làm lợi cho sản xuất nông nghiệp.

Hiện nay biện pháp tối ưu nhất để xử lý chất thải hữu cơ bằng công nghệ vi sinh học đã mang lại hiệu quả kinh tế cao, chống ô nhiễm môi trường.



Hình 9.13. Một số chủng VSV sử dụng trong xử lý phế thải (xem ảnh màu trang 363).

a – Các khuẩn lạc xạ khuẩn màu trắng – *Actinomadura madurae*, màu vàng – *Nocardia*, màu đỏ – *Micromonospora spp*; b – *Cellulomonas*; c – *Actinomycetes*; d – *Metarrhizium anisopliae*; e – *Lactobacillus acidophylus*; f – *Bacillus subtilis*.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Nguồn gốc phế thải hữu cơ và cách xử lý?
 2. Vai trò của vi sinh vật trong xử lý nước thải?
 3. Khu hệ vi sinh vật và các tác nhân gây bệnh trong nước thải?
 4. Quy trình xử lý chất thải rắn hiện nay?
 5. Quy trình xử lý nước thải hiện nay?
 6. Các hướng phát triển xử lý chất thải thân thiện với môi trường?
- * Chọn đáp án đúng nhất
7. Quá trình mà nhờ đó mọi tế bào sống, các bào tử sống, các virus và các viroid hoặc bị phá hủy hoặc bị loại bỏ khỏi một đối tượng hoặc một nơi sống được gọi là:
 - a. Tiêu độc;
 - b. Diệt khuẩn;
 - c. Sát khuẩn;
 - d. Sự tiệt trùng.
 - e. Định nghĩa được ứng dụng cho tất cả các ý trên.
 8. Sự xử lý nước thải thứ cấp sẽ loại các chất hữu cơ nhờ các quá trình nào sau đây?
 - a. Các quá trình sinh học;
 - b. Các quá trình vật lý;
 - c. Các quá trình hóa học;
 - d. Tất cả các ý trên đều đúng.
 9. Trong một kiểu xử lý nước thải thứ cấp, nước thải chảy theo chiều ngang qua một bể được thông khí và khuấy. Quá trình xử lý này được gọi là gì?
 - a. Hồ oxy hóa;
 - b. Xử lý bùn hoạt tính;
 - c. Xử lý lọc trích;
 - d. Hồ hấp nội sinh.
- * Điền vào các chỗ trống
10. Sự phá hủy toàn bộ vi sinh vật trong môi trường được gọi là.....
 11. Bức xạ từ ngoại làm hư hỏng..... trong một tế bào.
 12.là các chất hóa học được sinh ra bởi các VSV và nó giết chết hoặc kìm hãm các VSV khác.

GIẢI THÍCH THUẬT NGỮ

1. **Chất thải** còn được gọi là **rác**: Trong cuộc sống, chất thải được hình dung là những chất không còn được sử dụng cùng với những chất độc được xuất ra từ chúng.
2. **Phế thải**: là sản phẩm loại bỏ được thải ra trong quá trình hoạt động, sản xuất và chế biến của con người.
3. **Ô nhiễm nước là gì?** Theo bản chất các tác nhân gây ô nhiễm, người ta phân ra các loại ô nhiễm nước: ô nhiễm vô cơ, hữu cơ, ô nhiễm hóa chất, ô nhiễm sinh học, ô nhiễm bởi các tác nhân vật lý.

Chương 10

CHẾ PHẨM VI SINH VẬT VÀ CÁCH SỬ DỤNG

Mục tiêu

- Hiểu được một cách đầy đủ những lợi ích của việc sử dụng các chế phẩm vi sinh.
- Trang bị kiến thức cơ bản cho sinh viên về bản chất của từng loại chế phẩm vi sinh.
- Phân tích được cơ sở khoa học của việc sử dụng chế phẩm vi sinh vào xử lý và cải tạo môi trường.

10.1. CÁC DẠNG CHẾ PHẨM VI SINH VẬT

Chế phẩm vi sinh vật (*còn gọi là men vi sinh*) là hỗn hợp hoặc riêng biệt từng chủng vi sinh vật đang sống có hoạt tính sinh học cao đã được tuyển chọn, chúng được lưu giữ trong một chất mang vô trùng hay đông khô. Hàm lượng vi sinh vật trong chế phẩm thường đạt $10^9 - 10^{10}$ CFU/g và có độ an toàn cao cho con người được nên sử dụng rộng rãi trong sản xuất và đời sống.

Trong xử lý các vấn đề về môi trường, chế phẩm vi sinh đóng góp nhiều mặt rất tích cực, do đó được ứng dụng rộng rãi trong: xử lý nước thải, xử lý mùi hôi, xử lý dầu mỡ và chất hữu cơ,...

Trong nông nghiệp, các chế phẩm vi sinh phục vụ cho sản xuất phân bón thường có là: chế phẩm vi sinh vật cố định đạm, chế phẩm vi sinh vật giải lân, chế phẩm vi sinh vật phân giải cellulose (tạo mùn), vi sinh vật tạo kháng sinh và các chất điều hòa sinh trưởng,...

Trong nuôi trồng thủy sản, sử dụng chế phẩm sinh học nhằm mục đích cải thiện môi trường (nước và nền đáy ao), tăng sức khỏe vật nuôi, tăng khả năng hấp thu thức ăn... góp phần tăng năng suất và sản lượng.

Hiện nay, chế phẩm vi sinh vật được sản xuất theo nhiều hướng khác nhau, nhiều dạng khác nhau phụ thuộc vào điều kiện kinh tế xã hội, khoa học công nghệ, trình độ dân trí và điều kiện tự nhiên của mỗi nước trên thế giới nhưng đều theo mục tiêu: tiện cho người sử dụng và cho hiệu quả kinh tế cao nhất.

10.1.1. Chế phẩm vi khuẩn

10.1.1.1. Chế phẩm nhân nuôi trên môi trường thạch hoặc trên cơ chất gelatin

Loại chế phẩm này được sản xuất trong phòng thí nghiệm lớn, dùng môi trường dinh dưỡng của Fred (1932). Chế phẩm sau khi xuất xưởng thường được đựng trong các chai lọ thủy tinh.

Loại chế phẩm VSV này ưu điểm là: khuân lạc VSV thường nhìn thấy được, do đó có thể loại bỏ được ngay tạp khuân bằng một số hóa chất có sẵn trong phòng thí nghiệm mà không cần phải chuẩn bị các nguyên liệu đắt tiền.

Tuy nhiên loại chế phẩm VSV này còn có nhiều hạn chế, đó là số lượng VSV chuyên tính ít, thời gian bảo quản và sử dụng ngắn, chuyên chở vận chuyển xuống cơ sở sản xuất không tiện do đựng trong chai lọ thủy tinh dễ vỡ. Mặt khác, theo Vincent (1970) thì loại chế phẩm này có độ bám dính trên hạt giống không cao.

10.1.1.2. Chế phẩm vi sinh vật dạng dịch thể

Chế phẩm VSV dạng dịch thể được sản xuất trong phòng thí nghiệm hoặc trong nhà máy, xí nghiệp theo quy trình công nghệ lên men. Theo đó cần có hệ thống máy lắc lớn hoặc nồi lên men có hệ thống điều khiển tốc độ khí để tạo sinh khối lớn. Sau đó dịch VSV được đóng vào chai lọ hoặc bình nhựa.

Loại chế phẩm VSV này tiện lợi ở chỗ không cần pha hoặc trộn với nước mà có thể trộn luôn vào hạt giống. Cũng có thể ly tâm dịch vi sinh để cô đặc sinh khối, qua đó hạ giá thành sản xuất.

Tuy nhiên, loại chế phẩm VSV này cũng có những hạn chế, đó là khi nhiễm vào hạt giống, độ sống sót và độ bám dính của VSV trên hạt giống không cao. Chế phẩm phải luôn luôn bảo quản ở điều kiện lạnh, vì vậy khá tốn kém và không thuận tiện cho vận chuyển. Chi phí sản xuất chế phẩm thường tương đối cao vì dụng cụ chứa đựng đắt tiền. Gần đây một số cơ quan nghiên cứu, triển khai (NifTAL – Hoa Kỳ, DOA – Thái Lan, ICRISAT – Ấn Độ...) đã nghiên cứu thành công công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh vật dạng lỏng, trong đó quá trình nhân sinh khối vi sinh vật được gắn liền với việc xử lý sao cho mật độ vi sinh vật sau lên men luôn đáp ứng yêu cầu của tiêu chuẩn quy định, nghĩa là đạt mức từ hàng trăm triệu đến hàng tỷ vi sinh vật trong 1 ml. Ngoài ra, người ta cũng lợi dụng khả năng sinh bào tử, bào nang của một số vi sinh vật để sản xuất các chế phẩm vi sinh vật dạng lỏng, trong đó sau quá trình lên men một số hóa chất chuyển hóa tiềm sinh hoặc một số kỹ thuật bức chê oxy, điện thế oxy hóa khử hoặc điều kiện dinh dưỡng được áp dụng làm cho vi sinh vật chuyển từ dạng sinh dưỡng sang dạng tiềm sinh. Chế phẩm vi sinh vật dạng lỏng sản xuất theo công nghệ mới đã khắc phục được các nhược điểm của chế phẩm dịch thể kiểu cũ và đang được áp dụng rộng rãi tại nhiều nước như Mỹ, Nhật Bản, Canada, Australia và Việt Nam.

10.1.1.3. Chế phẩm vi sinh vật dạng khô

Năm 1965, Scolt và Bumganer đã chế tạo được một loại chế phẩm VSV dạng khô. Cách làm như sau: sinh khối vi sinh vật được cho vào bình sục khí để loại hết nước, ly tâm để tách VSV chuyên tính ra khỏi cơ chất và cho hấp thụ vào chất mang là bột cao lanh, sau đó cho hấp thụ tiếp vào CaSO_4 hoặc Na_2SO_4 để thu được chế phẩm VSV dạng khô.

Loại chế phẩm VSV dạng khô có ưu điểm là lưu giữ, vận chuyển rất thuận lợi, dễ dàng, chế phẩm không bị nhiễm tạp, sử dụng trong thời gian dài hơn 1 năm.

Những công nghệ sản xuất loại ché phẩm VSV này phức tạp, tốn kém, do đó hiệu quả kinh tế không cao.

10.1.1.4. Ché phẩm vi sinh vật dạng đông khô

Ché phẩm VSV dạng đông khô được sản xuất từ những năm 1940 – 1960 ở Mỹ, Úc, Nga. Để sản xuất loại ché phẩm này sau khi lên men, sinh khói vi sinh vật được đông khô lại ở nhiệt độ rất thấp (-20 đến -40 °C).

Loại ché phẩm VSV này có nhiều ưu điểm như ít bị nhiễm tạp ngay cả khi ở nhiệt độ rất cao, độ sống sót của VSV chuyên tính rất cao.

Ché phẩm cũng có hạn ché, đó là tỷ lệ bám dính và độ sống sót của VSV trên hạt thấp (Vincent, 1970) đồng thời sản xuất rất công phu và tốn kém.

10.1.1.5. Ché phẩm vi sinh vật dạng bột chất mang

Hiện nay hầu hết các nước trên thế giới đều sản xuất loại ché phẩm VSV trên nền chất mang, trong đó sinh khói vi sinh vật được tẩm nhiễm vào chất mang là các hợp chất hữu cơ hoặc không hữu cơ tự nhiên hoặc tổng hợp có tác dụng làm nơi trú ngụ và bảo vệ vi sinh vật chuyên tính trong ché phẩm từ khi sản xuất đến lúc sử dụng. Chất mang cần có các đặc điểm sau:

- Khả năng hút nước cao 150 – 200%;
- Hàm lượng carbon hữu cơ cao, tối đa > 60%;
- Không chứa các chất độc hại đối với vi sinh vật tuyển chọn, đất và cây trồng;
- Hàm lượng muối khoáng không vượt quá 1%;
- Kích thước hạt phù hợp với đối tượng sử dụng.

Loại chất mang thường được sử dụng nhiều nhất là than bùn. Ngoài ra có thể sử dụng đất sét, vermiculite, than đá, lignin, đất khoáng, bã mía, lõi ngô nghiền, vỏ trấu, vỏ cà phê, bột polyacrylamide, phân ủ... làm chất mang cho ché phẩm vi sinh vật.

Tại Hà Lan, người ta sử dụng chất mang từ than đá, than bùn trộn với thân thực vật nghiền nhỏ. Tại một số nước Đông Nam Á, người ta sử dụng chất mang từ bột cellulose, bột bã mía, lõi ngô, rác thải hữu cơ được nghiền nhỏ. Ở Ấn Độ, người ta dùng chất mang bằng bentonite trộn với bột cá. Gần đây, ở Mỹ người ta sử dụng chất mang từ bột polyacrylamide.

Ở Việt Nam, chất mang được sử dụng chủ yếu là than bùn. Gần đây, một số nhà khoa học đã nghiên cứu chế tạo chất mang từ rác thải hữu cơ, phế thải nông công nghiệp sau khi đã xử lý như rác thải sinh hoạt, mùn mía, bùn mía, cám trấu, mùn cưa...

Tùy theo điều kiện, người ta có thể khử trùng chất mang trước khi nhiễm sinh khói vi sinh vật để tạo ra ché phẩm vi sinh vật trên nền chất mang khử trùng hoặc tạo ra ché phẩm trên nền chất mang không khử trùng bằng cách phơi trộn sinh khói vi sinh vật chất mang sau khi xử lý mà không qua công đoạn khử trùng. Ưu điểm và hạn ché của hai dạng ché phẩm khử trùng và không khử trùng được trình bày trong bảng 10.1.

Loại chế phẩm trên nền chất mang có ưu điểm là quy trình sản xuất đơn giản, dễ làm, không tốn kém nhiều dẫn đến giá thành hạ, nguyên liệu sẵn có trong tự nhiên, mật độ VSV chuyên tính trong chế phẩm cao, dễ chuyên chở, tiện sử dụng, độ bám dính của VSV trên đối tượng sử dụng cao. Tuy nhiên, chế phẩm dạng chất mang bột cũng có những nhược điểm như dễ bị tạp nhiễm bởi vi sinh vật không chuyên tính, chất lượng không ổn định, độ sống sót của VSV trong chế phẩm không cao. Nếu không sử dụng kịp thời chế phẩm có thể bị loại bỏ hàng loạt vì không đảm bảo mật độ vi sinh vật chuyên tính.

Bảng 10.1. Ưu điểm và hạn chế của chế phẩm vi sinh vật chất mang khử trùng và không khử trùng

Loại chất mang	Ưu điểm	Hạn chế
Khử trùng	<ul style="list-style-type: none"> – Sử dụng cho quy mô sản xuất trung bình. – Có thể pha loãng được qua đó giảm chi phí đầu tư nồi lên men, môi trường và các nhu cầu khác. – Có chất lượng cao, thời gian tồn tại của vi sinh vật chuyên tính lâu. – Dễ đánh giá và kiểm tra chất lượng. – Thuận lợi cho việc sử dụng. 	<ul style="list-style-type: none"> – Cần khử trùng chất mang, vì vậy tốn kém và đòi hỏi điều kiện đặc biệt. – Cần nhiều nhân công và đầu tư trong quá trình sản xuất. – Cần có kỹ thuật và người có kinh nghiệm trong sản xuất.
Không khử trùng	<ul style="list-style-type: none"> – Sử dụng cho quy mô sản xuất trung bình và lớn. – Kỹ thuật phối trộn đơn giản. – Có thể sử dụng mọi loại vật liệu địa phương. – Đầu tư ít, không cần kỹ thuật đặc biệt và người có kinh nghiệm trong quá trình sản xuất. 	<ul style="list-style-type: none"> – Không pha loãng được sinh khối, do vậy cần phải lên men với số lượng lớn và cần nhiều môi trường. – Sản phẩm không bảo quản được lâu. – Khó đánh giá và kiểm tra chất lượng.

10.1.2. Chế phẩm vi nấm

10.1.2.1. Chế phẩm sợi nấm

Chế phẩm sợi nấm là loại chế phẩm được sản xuất từ sinh khối nấm, trong đó nấm chuyên tính được nhân sinh khối theo phương pháp lên men chìm hoặc lên men xốp (lên men trong giá thể có bổ sung dinh dưỡng – lên men trên môi trường bán rắn). Sau khi sinh khối hệ sợi nấm đạt cao nhất, thu hoạch hệ sợi, rửa sạch và loại bỏ nước bằng cách ly tâm

và phơi trong không khí để đạt độ ẩm 40%. Để sản xuất chế phẩm nấm rễ nội cộng sinh (Endomycorrhizae), người ta phải nuôi hệ sợi và bào tử nấm trong hệ rễ cây chủ, nghĩa là nhiễm nấm vào đất trồng cây chủ có hệ rễ phát triển như ngô, hay cỏ ba lá, thu hoạch hệ rễ cây chủ cùng đất trồng và sử dụng chúng như một loại chế phẩm. Sản phẩm dạng này phải được bảo quản trong điều kiện lạnh cho tới khi sử dụng. Ưu điểm của sản phẩm là dễ làm, ít tốn kém, song không bảo quản được lâu, có nguy cơ tạp nhiễm cao và hiệu lực không ổn định.

10.1.2.2. Chế phẩm bào tử

Để sản xuất chế phẩm bào tử, người ta nhân sinh khối nấm trong môi trường xốp đến khi bào tử nấm hình thành và chín, thu hồi sinh khối nấm cùng giá thể sau đó phơi khô và nghiền mịn.

Đối với một số nấm rễ lớn, người ta có thể sản xuất chế phẩm bào tử bằng cách nuôi trồng nấm, thu hái quả thể nấm, làm khô ở nhiệt độ phù hợp ($< 35^{\circ}\text{C}$), nghiền mịn cùng với chất mang và tạo sản phẩm dưới dạng bột hoặc viên. Ưu điểm của chế phẩm dạng này là có thể bảo quản được lâu, ít tạp nhiễm, chế phẩm có hiệu lực cao, ổn định. Để tránh tạp nhiễm từ bên ngoài, các thao tác nuôi, trồng, thu hoạch và chế biến phải được tiến hành trong điều kiện vô trùng, người sản xuất cần phải có kinh nghiệm và các trang thiết bị đắt tiền.

10.1.3. Chế phẩm virus

10.1.3.1. Chế phẩm dạng lỏng

Sinh khối virus trong cơ thể ký chủ được thu hồi bằng cách giết ký chủ, nghiền nhỏ, ly tâm loại cặn bã và bổ sung các chất phụ gia (chất chống thối, chất bám dính...), đóng chai và đưa đi sử dụng. Sản phẩm loại này dễ làm, song thời gian sử dụng ngắn, dễ tạp nhiễm.

10.1.3.2. Chế phẩm dạng bột khô

Sau khi bổ sung chất phụ gia như chế phẩm dạng lỏng, dịch virus được làm khô cùng với chất mang rồi đóng gói và mang đi sử dụng. Chế phẩm virus dạng bột có thể bảo quản được lâu hơn chế phẩm dạng lỏng.

10.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG CHẾ PHẨM VI SINH VẬT

Tùy theo mục đích, đối tượng sử dụng và đặc điểm của từng loại chế phẩm mà phương pháp sử dụng khác nhau. Đối với các chế phẩm vi sinh vật phục vụ trong trồng trọt và bảo vệ thực vật thường sử dụng các phương pháp sau:

10.2.1. Phương pháp nhiễm vào hạt giống

Ở một số nước trên thế giới có nền nông nghiệp phát triển, chế phẩm vi sinh vật làm phân bón hoặc phòng bệnh hại được nhiễm trực tiếp vào hạt thông qua quá trình xử lý hạt giống ở quy mô công nghiệp. Nghĩa là ngay sau khi xử lý hạt giống, người ta bọc luôn một

lớp chế phẩm VSV bên ngoài hạt. Công việc này được thực hiện trong các nhà máy, xí nghiệp xử lý hạt giống, sau đó hạt giống đã nhiễm vi sinh vật được giao cho các nông trang hoặc trại để gieo trồng.

Ở Việt Nam, chế phẩm VSV được hòa vào nước sạch (nếu chế phẩm dạng khô hoặc dạng chất mang) tạo thành dung dịch, sau đó trộn đều với hạt giống trước khi gieo. Để tăng độ bám dính của vi sinh vật vào bề mặt hạt giống, có thể bổ sung các chất keo vào dung dịch trước khi trộn với hạt giống, hoặc trộn hỗn hợp hạt giống + vi sinh + bột mịn (đất, phân chuồng hoai mục, bột đá vôi) để tạo ra lớp vỏ bọc kín hạt giống. Công việc trộn có thể thực hiện ngay tại ngoài đồng, khi đó nơi trộn phải là chỗ râm mát, tránh ánh nắng trực tiếp. Trộn xong đem gieo ngay trong thời gian ngắn nhất.

Phương pháp nhiễm trực tiếp vào hạt giống cho hiệu quả cao nhất, nhưng đòi hỏi kỹ thuật cao để tránh làm hạt giống bị xát và mất sức nảy mầm. Đối với hạt giống đã được xử lý thuốc trừ sâu, diệt nấm hóa học không nên sử dụng phương pháp này vì hóa chất độc hại sẽ tiêu diệt vi sinh vật chuyên tính.

10.2.2. Phương pháp hổ trợ cây

Ngâm rễ cây cùn non vào dung dịch chế phẩm vi sinh vật (nếu chế phẩm dạng chất mang thì phải hòa vào nước sạch) trong thời gian 6 – 24 giờ tùy loại chế phẩm và loại cây trồng. Cần tiến hành ở nơi râm mát, tránh ánh nắng trực tiếp.

Chú ý: Chỉ ngâm bộ rễ vào chế phẩm để vi sinh vật hữu ích nhiễm vào rễ cây.

Phương pháp này cho hiệu quả rất cao, nhưng mất nhiều thời gian và không tiện lợi cho người sử dụng. Phương pháp này không áp dụng đối với các loại cây rễ cọc, cây ăn quả.

10.2.3. Bón chế phẩm vi sinh vật vào đất

Theo phương pháp này có nhiều cách bón chế phẩm VSV:

- + Có thể trộn đều chế phẩm với đất nhão tơi, sau đó đem rắc đều vào luống trước khi gieo, trồng (nếu là ruộng cạn), hoặc rải đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).
- + Có thể đem chế phẩm ủ hoặc trộn với phân chuồng đã hoai mục, sau đó rải đều như bón phân.
- + Trộn chế phẩm VSV với đất hoặc với phân chuồng đã hoai mục, sau đó đem bón thúc sorm cho cây (càng bón sorm càng tốt).

10.2.4. Phun, tưới chế phẩm vi sinh vật lên cây hoặc vào đất

Theo phương pháp này, dùng chế phẩm hòa vào nước sạch, tưới hoặc phun trực tiếp vào cây hay vào đất. Đối với chế phẩm phân bón vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh nên tưới phủ sorm ngay khi cây cùn non vì vi khuẩn nốt sần cần xâm nhiễm vào rễ non để hình thành nốt sần. Các chế phẩm vi sinh vật bảo vệ thực vật được dùng chủ yếu bằng phương pháp này. Tuy nhiên, khi sử dụng phương pháp tưới phun phải cần lượng chế phẩm lớn hơn so với các phương pháp khác.

10.3. MỘT SỐ CHẾ PHẨM VI SINH VẬT THÔNG DỤNG

10.3.1. Chế phẩm EM

Chế phẩm EM hay EM là công nghệ vi sinh do Teruo Higa người Nhật Bản phát minh. Công nghệ này trở nên nổi tiếng và có ứng dụng rộng rãi ở nhiều nước. Từ công thức của chế phẩm EM, một số chế phẩm tương tự và nội địa hóa đã được sản xuất ở Việt Nam là chế phẩm GEM và VEM.

Trong nhiều năm qua, EM đã được nhân rộng và tái sản xuất. Những nhóm vi khuẩn khác nhau có thể được đưa vào một cách trực tiếp (EM1, EM2, EM3, EM4 và EM5) vào đất nông nghiệp.

10.3.1.1. Ứng dụng chế phẩm EM trong xử lý môi trường

Chế phẩm EM bao gồm 87 chủng VSV khác nhau, trong đó có 5 nhóm vi khuẩn lên men là lactic, lên men rượu, vi khuẩn quang hợp, xạ khuẩn và nấm men. Được dùng để xử lý mùi hôi rác thải, nước thải, chuồng trại chăn nuôi, nền sàn sản xuất thực phẩm – thuỷ sản, công rãnh...

– Quá trình oxy hoá tự nhiên các chất hữu cơ làm giảm lượng oxy hoà tan, đồng thời tạo ra các chất độc: H_2S , NH_3 , SO_2 ... gây ô nhiễm môi trường. Khi sử dụng chế phẩm EM, ta đã đưa vào môi trường các loại VSV hữu hiệu thúc đẩy quá trình oxy hoá hoàn toàn các chất hữu cơ nên hạn chế sự phát sinh mùi hôi.

– Chế phẩm EM có thể giúp cho hệ vi sinh vật tiết ra các enzyme phân huỷ như lignin peroxidase. Các enzyme này có khả năng phân huỷ các hoá chất nông nghiệp tồn dư, thậm chí cả dioxin.

– Những vi sinh vật có trong EM có khả năng tiết ra acid hữu cơ, enzyme, những chất chống oxy hoá và các phức kim loại. Sự tạo ra môi trường chống oxy hoá bởi EM đã tăng quá trình tách rắn – lỏng, nhờ vậy mà góp phần quan trọng vào việc làm sạch nước.

– Quá trình phân huỷ các chất hữu cơ còn làm giảm lượng mùn trong hầm cầu, tăng quá trình phân huỷ các chất thải trong hầm chứa, giảm thiểu các chất khí tạo ra mùi hôi, thối.

– Tăng cường các quá trình trao đổi, phân giải các chất hữu cơ trong bể chứa chất thải, làm giảm sự hình thành màng hữu cơ trên bề mặt bể nên ngăn chặn hiện tượng đầy giả tạo và tắc nghẽn sự lưu thông khí của hệ thống, công trình.

10.3.1.2. Ứng dụng chế phẩm EM trong xử lý rác thải sinh hoạt

Cách sử dụng EM trong vận chuyển và xử lý rác thải sinh hoạt và nước rỉ rác:

– Tại trạm trung chuyển: rác thải sau thu gom sẽ chuyển đến trạm trung chuyển. Mỗi ngày các đơn vị chế phẩm EM được cấp theo khối lượng thu gom thực tế pha tỷ lệ 1 : 1 với nước sạch để phun lên mặt rác khi vận hành ép rác và xịt lên nền.

– Xe vận chuyển rác: đối với rác thải được vận hành trực tiếp đến bãi rác trong quá trình thu xe vận chuyển sẽ lắp đặt thiết bị phun chế phẩm EM và hương khử mùi bằng các vòi phun sau xe để giảm mùi hôi khi vận chuyển.

– Tại bãi rác: rác sau khi được vận chuyển đến chôn lấp tại bãi rác sẽ được phun dịch EM lên toàn bộ bề mặt theo tỷ lệ 1 : 50 hoặc 1 : 100 lên rác thải khi đã được san ủi xong, sau đó đổ liên tiếp và tiếp tục như thế (dùng theo định mức 05/BXD 0,6 lít/1 tấn rác).

– Tại hồ tùy nghi: ở hồ này hằng ngày được phun EM mỗi ngày hai lần theo công thức 50 ml/1 m³ nước thải và chế phẩm đa enzyme Enchoice Solution.

Mùi hôi thối của rác thải là do một nhóm VSV tạo ra. Do vậy, khi sử dụng chế phẩm EM thì trong chế phẩm sẽ có nhóm VSV úc chế nhóm VSV trong rác thải. Sau đó các VSV có ích này tiếp tục phát triển bằng cách phân huỷ dần các chất thải có nguồn gốc hữu cơ.

10.3.2. Chế phẩm cố định nitơ

10.3.2.1. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ (Biological nitrogen fixing fertilizer) (tên thường gọi: phân vi sinh vật cố định đạm, phân đạm vi sinh) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống (tự do, hội sinh, cộng sinh, ky khí hoặc hiếu khí) đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng cố định nitơ cung cấp các hợp chất chứa nitơ cho đất và cây trồng; tạo điều kiện nâng cao năng suất cây trồng và (hoặc) chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ không gây ảnh hưởng xấu đến người, động thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

10.3.2.2. Yêu cầu của phân bón cố định đạm

Yêu cầu chất lượng đối với chế phẩm vi sinh vật cố định nitơ nói riêng và phân bón vi sinh vật nói chung là phải có hiệu quả đối với đất và cây trồng, nghĩa là có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng phát triển của cây trồng, đến năng suất hoặc chất lượng nông phẩm hoặc độ phì của đất.

Mật độ vi sinh vật chuyên tính trong sản phẩm phải bảo đảm các tiêu chuẩn ban hành. Tuỳ theo điều kiện của từng quốc gia, mật độ vi sinh vật chuyên tính trong 1 gam hoặc mililit chế phẩm dao động $10^7 - 10^{10}$ CFU đối với chế phẩm trên nền chất mang khử trùng và $10^5 - 10^6$ CFU đối với chế phẩm trên nền chất mang không khử trùng. Theo tiêu chuẩn Việt Nam, mật độ vi sinh vật chuyên tính trong chế phẩm phải đạt 10^8 CFU/g đối với chế phẩm trên nền chất mang khử trùng và 10^5 CFU/g đối với chế phẩm trên nền chất mang không khử trùng.

Tuỳ theo yêu cầu của từng nơi, người ta còn đưa thêm các tiêu chuẩn kỹ thuật khác đối với từng loại chế phẩm cụ thể như khả năng cố định nitơ trong môi trường chứa 10 g đường (đối với *Azotobacter*) hoặc khả năng tạo nốt sần trên cây chủ đối với vi khuẩn nốt sần...

10.3.2.3. Phương pháp sử dụng chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ

Có rất nhiều cách bón chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ khác nhau, dựa vào từng loại cây trồng khác nhau sao cho hiệu quả cao nhất.

+ Đối với chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ tự do thường được hò (tẩm nhiễm) vào hạt hoặc rễ cây khi còn non, hay bón trực tiếp vào đất, nhưng nhìn chung bón càng sớm càng tốt.

+ Đối với chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ cộng sinh thường được trộn vào hạt giống trước khi gieo hạt hoặc tưới phủ sorm không muộn quá 20 ngày sau khi cây mọc.

a) Bón chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ vào đất

Theo phương pháp này có nhiều cách bón chế phẩm cố định nitơ:

+ Có thể trộn đều chế phẩm với đất nhão tươi, sau đó đem rắc đều vào luống trước khi gieo hạt trên ruộng cạn; hoặc rắc đều ra mặt ruộng nước.

+ Có thể đem chế phẩm ủ hoặc trộn với phân chuồng đã hoai mục, sau đó bón đều vào luống rồi gieo hạt (nếu là ruộng cạn); hoặc rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).

+ Người ta có thể trộn chế phẩm vi khuẩn với đất hoặc với phân chuồng đã hoai mục, sau đó đem bón thúc sorm cho cây (càng bón sorm càng tốt).

Phương pháp này nhằm tăng số lượng vi sinh vật hữu ích vào đất.

b) Phương pháp phun chế phẩm vi khuẩn cố định nitơ lên cây hoặc vào đất

Theo phương pháp này, khi cây đã nảy mầm, dùng chế phẩm hòa vào nước sạch tưới trực tiếp vào cây hay vào đất (người ta thường gọi là phương pháp tưới phủ sorm).

Có rất nhiều tên gọi chế phẩm vi khuẩn cố định N khác nhau: Nitragin; Ridafo; Rhizobin; Rizolu; Azotobacterin; Flavobacterin; Azogin; Enterobacterin...

10.3.3. Phân lân vi sinh

10.3.3.1. Yêu cầu chất lượng và công tác kiểm tra chất lượng

Tại Việt Nam trong sản xuất phân lân VSV trên nền chất mang không khử trùng, các nhà sản xuất thường sử dụng quặng phosphorit bô sung vào chất mang. Việc làm này có lợi là tận dụng được nguồn quặng tự nhiên sẵn có của địa phương, qua đó giảm chi phí đầu tư trong quá trình sản xuất. Tuy nhiên, để phân bón có hiệu quả cần phải kiểm tra đánh giá khả năng phân giải quặng của các chủng VSV sử dụng và khả năng tồn tại của chúng trong chất mang được bổ sung quặng.

Yêu cầu chất lượng đối với phân lân vi sinh cũng tương tự như yêu cầu chất lượng đối với phân vi sinh vật cố định nitơ, nghĩa là phân lân vi sinh vật được coi là có chất lượng tốt khi có chứa một hay nhiều loài VSV có hoạt tính phân giải lân cao, có ảnh hưởng tốt đến cây trồng với mật độ $10^8 - 10^9$ CFU/g hay ml phân bón đối với loại phân bón trên nền chất mang khử trùng và 10^6 CFU/gam hay ml đối với phân bón trên nền chất mang không khử trùng. Để phân bón vi sinh vật có chất lượng cao, cần tiến hành kiểm tra chất

lượng sản phẩm tạo ra sau mỗi công đoạn sản xuất tương tự như công tác kiểm tra chất lượng trong sản xuất phân vi sinh vật cố định nitơ.

10.3.3.2. Phương pháp bón phân lân vi sinh

Phân lân vi sinh thường được bón trực tiếp vào đất, người ta ít dùng loại phân này để trộn vào hạt. Có nhiều cách bón khác nhau:

+ Có thể trộn đều chẽ phẩm với đất nhão toิ, sau đó đem rắc đều vào luống trước khi gieo hạt (nếu là ruộng cạn); rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).

+ Có thể đem chẽ phẩm ủ hoặc trộn với phân chuồng đã hoai mục, sau đó bón đều vào luống rồi gieo hạt (nếu là ruộng cạn); hoặc rắc đều ra mặt ruộng (nếu là ruộng nước).

+ Có thể trộn chẽ phẩm VSV với đất hoặc với phân chuồng đã hoai mục, sau đó đem bón thúc sớm cho cây (càng bón sớm càng tốt).

Phương pháp này nhằm tăng số lượng vi sinh vật hữu ích vào đất.

* Phân lân hữu cơ vi sinh Sông Gianh



Hình 10.1. Phân lân hữu cơ vi sinh Sông Gianh.

Thành phần

Độ ẩm: 30%; Hữu cơ: 15%; P₂O₅: 1,5%;

Acid Humic: 2,5%; Trung lượng: Ca, Mg, S; Các chủng vi sinh vật hữu ích: 3×10^6 CFU/g.

Tác dụng

Cải tạo đất, tăng độ phì nhiêu và toí xốp. Tăng sức đề kháng cho cây trồng. Kích thích bộ rễ phát triển mạnh, sinh trưởng tốt. Nâng cao năng suất và giá trị nông sản.

Hướng dẫn sử dụng

Bón lót, bón đại trà. Lượng bón tùy theo nhu cầu của từng loại cây trồng (đơn vị tính sào Bắc Bộ: 360 m²).

LOẠI CÂY	LUỢNG BÓN
Lúa, ngô, khoai, sắn, lạc, rau màu...	30 – 35 kg/sào
Cây ăn quả, cà phê, cao su...	1 – 1,5 kg/cây
Chè	50 – 70 kg/sào

10.3.4. Chẽ phẩm sinh học BIMA (Trichoderma)

Đặc tính về sản phẩm BIMA:

10.3.4.1. Thành phần

- Các chủng nấm Trichoderma: 5×10^6 bào tử/gam.
- Hữu cơ: 50%; độ ẩm < 30%.

10.3.4.2. Công dụng

– Chứa nấm đối kháng Trichoderma có khả năng tiêu diệt và khống chế ngăn ngừa các loại nấm bệnh hại cây trồng gây bệnh xì mủ, vàng lá thối rẽ, chét yếu, héo rũ như: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora sp.*, *Sclerotium rolfsii*...

– Tạo điều kiện tốt cho vi sinh vật cố định nitơ phát triển sống trong đất trồng. Kích thích sự tăng trưởng và phục hồi bộ rễ cây trồng.

– Phân giải tốt các chất xơ, chitin, lignin, pectin... trong phế thải hữu cơ thành các đơn chất dinh dưỡng, giúp cho cây hấp thu được dễ dàng.

– Kết hợp với phân hữu cơ có tác dụng cải tạo đất xốp hơn, chất mùn nhiều hơn, tăng mật độ côn trùng có ích và giữ được độ phì của đất.

10.3.4.3. Hướng dẫn sử dụng

– Bón trực tiếp cho cây trồng.

Có thể dùng để tưới: hoà 1 kg chế phẩm BIMA với 30 lít nước.

– Quy trình ủ phân chuồng, xác bã thực vật:

Cứ 3 – 4 kg chế phẩm BIMA; 20 – 30 kg super lân trộn đều với 1 tấn phân chuồng, xác bã thực vật.

Phun dung dịch urea (1 kg urea/100 lít nước) vào đống ủ cho ướt đều, độ ẩm đạt 50 – 55% (dùng tay vắt chặt hỗn hợp trộn, thấy nước rịn ra là được).

Đảo trộn và đập bạt, sau 4 – 5 ngày, nhiệt độ sẽ lên khoảng 60 °C. Tiến hành đảo trộn. Nếu thấy khô, phun nước vào để tạo độ ẩm.

Sau 25 – 30 ngày, đảo lại một lần, phun nước để đảm bảo độ ẩm 50 – 55%. Nếu phân chưa hoai mục, ủ tiếp đến 30 ngày sau thì phân hoai mục hoàn toàn, có thể đem sử dụng.

Sản phẩm phân hữu cơ thu được có thể trộn với phân NPK, urea, super lân, kali và các loại tro trấu.

Bảng 10.3. Hướng dẫn sử dụng chế phẩm sinh học BIMA (Trichoderma)

Cây trồng	Liều lượng	Cách bón
Bầu ướm cây con.	1 – 2 kg/1 m ³ giá thể ướm cây	– Trộn đều với giá thể ướm trước khi vô bầu.
Cây rau màu (Cà chua, dưa leo, dưa hấu, khổ qua ót, rau cải các loại...).	3 – 6 kg/1000 m ²	– Trộn với phân hữu cơ để bón đất trước khi trồng. – Bón thúc bổ sung 1 – 2 lần/1 vụ.
Cây công nghiệp (cà phê, tiêu, điều).	4 – 8 kg/1000 m ²	– Trộn với phân hữu cơ bón 1 – 2 lần/năm.
Cây ăn trái (Sầu riêng, cam, quýt, bưởi, xoài...).		– Bón trực tiếp vào xung quanh gốc cây.

10.3.5. Chế phẩm sinh học xử lý nước thải BIO-EM

Chế phẩm sinh học xử lý nước thải BIO-EM, giúp giảm chỉ Số COD, BOD, TSS... giảm tối đa mùi hôi, diệt vi khuẩn gây bệnh. Tăng cường mật độ vi sinh vật hữu ích cho hệ thống xử lý. Giảm ô nhiễm môi trường.

Chỉ tiêu chất lượng sản phẩm:

- BIO-EM gồm tổ hợp chủng vi sinh vật được phân lập sản xuất lên men từ hệ thống lên men tùng chủng vi sinh vật, hoạt tính của các chủng vi sinh vật chứa trong BIO-EM cao.
- Tổng số vi sinh vật: $\geq 10^9$ CFU/g.

Tác dụng:

- Xử lý nhanh nguồn nước ô nhiễm;
- Phân giải nhanh chất thải hữu cơ;
- Xử lý làm sạch hệ thống xử lý nước thải;
- Khử mùi hôi chất thải hữu cơ;
- Phân hủy các thành phần khó tiêu như: protein, tinh bột, cellulose, kitin, pectin, lipid, ...;
- Chuyển hóa thành phần khó tiêu thành dễ tiêu trong nước thải;
- Giảm chỉ số COD, BOD, TSS... khi sử dụng chế phẩm;
- Khôi phục lại hệ vi sinh trong hệ thống xử lý và môi trường;
- Diệt mầm bệnh và các vi khuẩn gây mùi hôi thối.

Ứng dụng cho hệ thống: Xử lý nước thải bệnh viện, sinh hoạt, thực phẩm, chế biến thủy sản...

Cách sử dụng: cẩn cứ vào các chỉ tiêu hệ thống xử lý nước thải.

Bảo quản: Tránh ánh sáng trực tiếp, để nơi khô ráo thoáng mát.

Hạn sử dụng: 1 năm kể từ ngày sản xuất.

10.3.6. Chế phẩm sinh học “Vườn Sinh Thái” đối với nuôi trồng thủy sản



Hình 10.2. Chế phẩm sinh học “vườn sinh thái” chuyên dùng.

Gồm 18 loại amono acid:

- Các chủng vi sinh vật hữu ích;
- Các khoáng chất vi lượng, đa lượng, trung lượng;
- Các vitamin (A, B,C...);
- Các các loại men (enzyme)...các dinh dưỡng thiết yếu...

Những thành phần này giúp tôm – cá hấp thụ đầy đủ dinh dưỡng, tối ưu hóa được lượng thức ăn sử dụng (giảm chi phí

thức ăn từ 7 – 12%), sinh trưởng phát triển tốt, tăng sức đề kháng chống chịu bệnh dịch

nên hạn chế được việc sử dụng thuốc kháng sinh, tăng trọng nhanh, phục hồi thể trạng, môi trường ao nuôi sạch sẽ và hạn chế tình trạng ô nhiễm, chất lượng thịt tăng, cho thu hoạch sớm so với đại trà từ 20 – 30 ngày. Các chủng vi sinh vật hữu ích trong chế phẩm có khả năng ức chế các khuẩn gây hại, tăng lượng oxy hòa tan, tăng khả năng miễn dịch.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các chế phẩm vi sinh vật (vi khuẩn, vi nấm, virus) rất đa dạng, được sử dụng phổ biến trên thế giới và trong nước trong lĩnh vực trồng trọt, chăn nuôi, nuôi trồng thủy sản, xử lý và cải tạo môi trường.

Giới thiệu thành phần tác dụng và cách dùng của một số chế phẩm vi sinh hữu ích. Có thể áp dụng tại Việt Nam trong điều kiện hiện nay.

Khi sử dụng các chế phẩm vi sinh cần lưu ý:

- Tránh ánh nắng mặt trời.
- Không sử dụng đồng thời thuốc trừ sâu và thuốc diệt cỏ.
- Sử dụng đúng liều lượng và đủ thời gian theo các quy định ghi trên chế phẩm.

CÂU HỎI VÀ BÀI TẬP

1. Các dạng chế phẩm vi sinh hiện nay?
2. Cơ sở khoa học của việc ứng dụng chế phẩm sinh học vào xử lý rác thải hữu cơ?
3. Cơ sở khoa học của việc ứng dụng chế phẩm sinh học vào xử lý nước thải?
4. Khi sử dụng chế phẩm vi sinh vào chăn nuôi, trồng trọt cần lưu ý đặc điểm nào?
5. Các phương pháp sử dụng chế phẩm vi sinh hiện nay?
6. Vì sao việc sử dụng chế phẩm vi sinh vật tại Việt Nam chưa được quan tâm đúng mức?

Chọn đáp án đúng nhất

7. Quy trình tạo chế phẩm vi sinh từ vi khuẩn được tiến hành theo các bước chính như sau:
 - a. Nuôi cấy giống vi khuẩn; b. Nhân giống cấp 1; c. Nhân giống cấp 2;
 - d. Hấp phụ vào chất mang; e. Kiểm tra chất lượng chế phẩm;
 - f. Đóng gói và bảo quản; j. Tất cả các bước trên.
8. Chủng xạ khuẩn sinh kháng tạo chế phẩm dùng trong bảo vệ thực vật được chọn theo những tiêu chí nào?
9. Những điểm cần lưu ý khi sử dụng chế phẩm thuốc trừ sâu VSV trong bảo vệ thực vật?
10. Một số điểm cần chú ý khi sử dụng phân vi sinh vật của Việt Nam?

Điền vào các chỗ trống

11. Chế phẩm vi sinh vật dạng(a)....tiện lợi cho quá trình bảo quản và vận chuyển hơn chế phẩm dạng....(b)....
12. Khi sử dụng chế phẩm vi sinh vật, tùy theo đối tượng bệnh cây có thể(a)..... phun cho cây hoặc....(b).....

THỰC HÀNH VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG

Phần 1. NHỮNG CHỈ DẪN CHUNG

1. QUY ĐỊNH KHI THỰC HÀNH

Khác với thí nghiệm của những môn học khác, người tham gia thí nghiệm vi sinh vật học môi trường thường xuyên tiếp xúc với vi sinh vật (VSV), hoặc canh trường, vật chứa VSV. Ngoài các VSV có ích cho sản xuất và đời sống, trong thí nghiệm chúng ta còn phải tiếp xúc với những VSV có hại hoặc gây bệnh... Vì vậy, khi tiến hành thí nghiệm, thao tác không thận trọng, chính xác có thể gây ra những hậu quả sau:

- Canh trường vi sinh vật bị nhiễm tạp khuẩn.
- Kết quả thí nghiệm thiếu chính xác dẫn đến kết luận sai, lãng phí thời gian, hóa chất, nguyên liệu.
- Người làm thí nghiệm có thể nhiễm bệnh hoặc làm người khác lây nhiễm.

Để tránh những trường hợp đáng tiếc có thể xảy ra trong khi thí nghiệm, sinh viên cần phải tôn trọng và thực hiện nghiêm chỉnh những quy tắc sau:

- Khi làm việc trong PTN sinh viên phải mặc áo blouse và cài khuy đầy đủ.
- Phải tuân thủ trật tự, ngăn nắp và vệ sinh của phòng thí nghiệm.
- Không để dây vi sinh vật ra bàn ghế, sách vở, quần áo, tay hoặc các vật dụng khác.

Trường hợp có VSV dây ra bàn, ghế... phải xử lý ngay bằng dung dịch lugol 3% hoặc phenol 5%, đổ dung dịch này lên và để trong 30 phút, với những VSV có bào tử thì để lâu hơn.

– Các dụng cụ thí nghiệm như kẹp gấp, kéo, que cây, que trang, khoan đồng... dùng xong phải rửa sạch, sấy khô trong tủ sấy.

– Không hút thuốc lá, ăn uống hoặc đi lại lộn xộn, nói chuyện ồn ào trong khi làm thí nghiệm.

– Không tự tiện điều chỉnh hoặc sử dụng những thiết bị của phòng thí nghiệm khi chưa được hướng dẫn.

– Sau khi làm thí nghiệm phải sắp xếp gọn gàng, làm vệ sinh nơi làm việc, chùi rửa dụng cụ thí nghiệm và phải bàn giao lại đầy đủ cho cán bộ phòng thí nghiệm.

Trước khi ra khỏi phòng thí nghiệm phải rửa tay kỹ bằng xà phòng. Trường hợp cần thiết phải sát trùng bằng cồn 60 – 75%.

2. MỘT SỐ THIẾT BỊ, DỤNG CỤ THÍ NGHIỆM CẦN THIẾT

2.1. Thiết bị

Máy móc trong phòng thí nghiệm dùng để nghiên cứu VSV có nhiều loại, nhưng có một số loại rất cần thiết, phải dùng thường xuyên, do đó cần hiểu biết và nắm vững phương pháp sử dụng.

1) Tủ ấm nuôi cấy vi sinh vật

Tủ ấm nuôi cấy VSV là thiết bị quan trọng trong công tác nghiên cứu VSV môi trường, vì nhiệt độ trong tủ có thể thay đổi từ 20 – 60 °C tùy theo ý muốn của người nghiên cứu và nhiệt độ trong tủ sau khi đã được xác định thì luôn luôn ở trạng thái ổn định trong suốt thời gian nuôi cấy. Tùy vào đối tượng nuôi cấy mà ủ ở nhiệt độ khác nhau để vi sinh vật có thể sinh trưởng tốt. Ví dụ: Coliform 30 °C/24 – 48 giờ, *E. coli* thích hợp ở 44 °C/24 – 48 giờ.

Cách sử dụng

Sau khi găm điện, xoay núm điều chỉnh nhiệt độ lớn cho kim chỉ tới nhiệt độ cần thiết. Ví dụ để ở nhiệt độ 30 °C, sau phải điều chỉnh kim ở núm điều chỉnh nhiệt độ nhỏ về số 0. Nhiệt độ trong tủ ấm tăng dần và đạt tới nhiệt độ trong phạm vi đã xác định. Theo dõi nhiệt kế cảm trên tủ ấm, nếu thấy có sự tăng giảm thì tiếp tục điều chỉnh cho tới khi đạt yêu cầu.



Hình 1. Tủ ấm (trái) và tủ sấy (phải).

Những điểm cần lưu ý

Trước khi sử dụng tủ ấm nuôi cấy vi sinh vật thì phải kiểm tra bộ phận điều chỉnh nhiệt độ xem có chính xác không? Nhiệt độ trong tủ có đều không?

Thường xuyên theo dõi sự thay đổi của đèn đỏ, đèn xanh. Bình thường đèn thay đổi 1 – 2 lần trong một phút, nếu có bất thường phải tắt điện và kiểm tra lại.

2) Tủ sấy khô

Dùng để sấy khô, khử trùng các loại dụng cụ chịu được sức nóng khô, chủ yếu là dụng cụ thủy tinh, đồ sứ (ống nghiệm, ống tiêm, ống hút, hộp lồng (đĩa Petri), cốc, phễu... cối chày sứ... Các đồ kim khí, dao, kéo, cặp sắt thẳng). Tùy vào đối tượng cần khử trùng mà sấy ở chế độ t^0 và thời gian khác nhau, thường sấy ở $160\text{ }^0\text{C}/2$ giờ, hoặc $180\text{ }^0\text{C}/30$ phút.

Chú ý: Các vật dụng khác như bông, băng, vải... nhất là cao su và môi trường nuôi cây, không được dùng tủ sấy khô để khử trùng.

3) Tủ lạnh

Tủ lạnh dùng để giữ giống vi khuẩn, vi nấm, virus và bảo quản các loại huyết thanh, các loại vaccine, các môi trường đã pha chế, các chế phẩm sinh học, khoanh giấy tẩm chất kháng sinh...), hóa chất, thuốc thử dễ phân hủy ở nhiệt độ thường.

Tủ lạnh $0 - 4\text{ }^0\text{C}$ dùng để giữ giống vi khuẩn, xạ khuẩn, vi nấm.

Tủ lạnh -15 đến $-80\text{ }^0\text{C}$ gọi là tủ lạnh sâu được dùng để giữ giống VSV lâu dài hơn.

4) Nồi hấp hơi nước cao áp (autoklave)

Thiết bị này cấp nhiệt bằng hơi nước ở áp suất cao (hơi nước bão hòa ở áp suất cao), được sử dụng để hấp khử trùng môi trường, một số nguyên liệu và dụng cụ thí nghiệm. Tùy đối tượng mà sử dụng ở chế độ nhiệt độ và áp suất thích hợp, thường dùng ở $121\text{ }^0\text{C}/1\text{ atm}/15$ phút. Hay $127\text{ }^0\text{C}/1,5\text{ atm}/30$ phút với môi trường đất, $117\text{ }^0\text{C}/0,8\text{ atm}/15$ phút với môi trường chứa nhiều đường, môi trường sữa.

Chỉ số áp kế (atm)	0	0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,5	2,0
^0C hơi nước	100	105	110	112	114	116	117	119	121	127	134

Để loại bỏ không khí trong nồi ra có hai cách

– Cách 1: Đóng khóa thoát hơi để tăng áp lực trong nồi lên đến khoảng 0,3 atm, tiếp đến cho xì thoát hết hơi nước ra, sau đó khóa van lại và cho tăng áp suất.

– Cách 2: Mở khóa thoát hơi và đun cho đến khi hơi nước bắt đầu thoát ra thành một luồng hơi trắng khá mạnh, khá đều thì đóng van lại và cho tăng áp suất.

Cách sử dụng nồi hấp cao áp

– Đổ nước vào nồi hấp với lượng vừa đủ (xem ở vạch ngang ghi trên một ống thủy tinh lắp bên ngoài nồi hấp).

– Các dụng cụ đem hấp phải được bao gói kỹ, đối với các bình và ống môi trường có nút bông phải bọc bằng dây dầu để tránh hơi nước làm ướt nút.

– Khi sắp xếp dụng cụ vào nồi hấp không nên để sát nhau quá, để vật nặng ở dưới, vật nhẹ ở trên.

– Đậy nắp, khóa chặt các ốc theo từng đôi đối xứng nhau để khởi vênh, khởi hở, khi tháo khóa cũng phải làm như vậy.

– Cắm điện, theo dõi kim đồng hồ áp lực kế. Loại hết không khí trong nồi theo một trong hai phương pháp đỗ nêu trên.

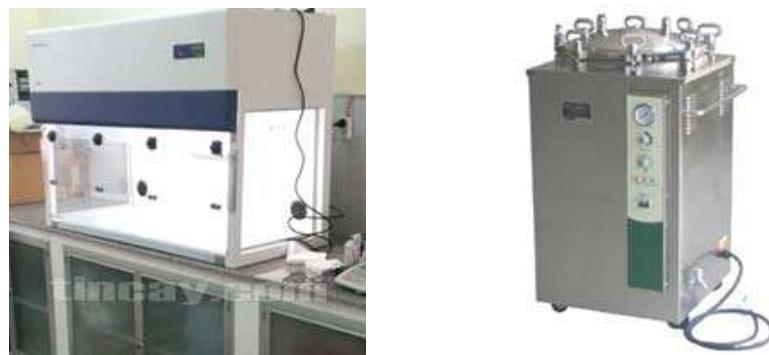
– Nếu nồi hấp tự động (cài đặt nhiệt độ và thời gian thích hợp), nếu là nồi thủ công cần theo dõi nhiệt độ trên nhiệt kế và kim chỉ áp lực trên đồng hồ áp lực kế.

– Khi đạt tới thời gian cần thiết thì ngắt điện và đợi cho áp lực hạ dần xuống, nhiệt độ trong nồi giảm hẳn rồi mới mở nắp lấy dụng cụ đã khử trùng ra. Chú ý, tránh hạ áp lực đột ngột bằng cách mở van xì hơi ra quá mạnh sẽ làm rạn nứt hoặc vỡ dụng cụ. Cũng không nên để nồi hấp nguội lạnh mới lấy dụng cụ ra, vì lúc này nắp nồi sẽ hút chặt vào miếng đệm cao su rất khó mở.

Các dụng cụ lấy ra không được để ở nền gạch men, nền đá, nền xi măng (vì dụng cụ đang nóng gấp lạnh sẽ vỡ, nứt).

5) Tủ cấy vô khuẩn có đèn cực tím (UV) (flux laminar)

Cần có không gian vô trùng được sử dụng để thao tác với vi sinh vật nhờ hệ thống đèn tử ngoại và bộ phận thổi khí vô trùng.



Hình 2. Tủ cấy ESCO PCR-4A1 (trái) và nồi hấp (phải).

6) Máy ly tâm (centrifuge)

Máy ly tâm dùng tách các chất ở các pha rắn – lỏng ra khỏi nhau như tách sinh khối tế bào ra khỏi môi trường nuôi cấy, tách hồng cầu, enzyme...



Hình 3. Máy ly tâm (trái) và máy lắc (phải).

7) Máy lắc (shaker): Máy lắc là thiết bị dùng để nuôi cây, nhân giống vi sinh vật bằng cách lắc các bình nuôi cây theo các chiều khác nhau (lắc vòng và lắc ngang) một cách đều đặn để tăng lượng oxy hòa tan trong môi trường (hình 3).

8) Máy cắt nước một lần (Bibby W4000): dùng để cắt nước.

9) Bể ủ nhiệt (water bath): Bể ủ nhiệt chứa nước và được cài đặt ở nhiệt độ nhất định để ủ định nhiệt độ cho những thí nghiệm cần sự ổn định về nhiệt độ.



Hình 4. Máy cắt nước hai lần A.4000 (trái) và bể ủ nhiệt (phải).

10) Máy đo pH (pH meter): đo pH dung dịch, môi trường nuôi cây,...



Hình 5. Máy đo pH để bàn (trái), Máy đo pH cầm tay (phải)

2.2. Dụng cụ

1) Các dụng cụ thủy tinh

Dụng cụ thủy tinh: có nhiều loại với nhiều kích cỡ khác nhau như bình nón, ống nghiệm, đĩa Petri, ống đong, cốc đong, bình định mức... yêu cầu phải sạch, trong suốt, trung tính. Trước khi dùng đựng môi trường dụng cụ thủy tinh phải được sấy khô, làm nứt bong và khử trùng trong tủ sấy khô.

Đối với dụng cụ đã qua sử dụng còn chứa môi trường và vi sinh vật, cần khử trùng rồi mới rửa sạch bằng xà phòng, phơi và sấy khô.....

Đối với dụng cụ bị bám bẩn, cần ngâm vào dung dịch sulfochromate vài giờ, sau đó rửa lại bằng nước sạch.

Đèn cồn, giá ống nghiệm, que cây, kẹp, kéo, bơm tiêm nhựa, đầu típ, bếp điện,...

Dụng cụ sạch khi đưa lên ánh sáng không có vết mờ và vết bợn.

2) Nồi lên men (fermenter): thiết bị lên men nuôi cây vi sinh vật.



Hình 6. Nồi lên men mini (trái); cân điện tử GR AND (giữa) và cân kỹ thuật (phải).

3) Cân phân tích điện tử (analyticalbalance)

Cân phân tích điện tử trọng lượng từ $100 \mu\text{g}$ – 200 g . Độ chính xác 10^{-4} g . Cân kỹ thuật (technical balance) – độ chính xác 10^{-2} g . Dùng cân hóa chất, môi trường.

3. XỬ LÝ VÀ BAO GÓI DỤNG CỤ, VẬT LIỆU THÍ NGHIỆM

3.1. Xử lý các dụng cụ thủy tinh

Các dụng cụ thủy tinh mới mua về trước khi sử dụng phải rửa thật sạch bằng nước vòi, sau đó đem ngâm qua đêm trong dung dịch HCl hay H_2SO_4 1 – 2% rồi rửa nước vòi thật kỹ, tráng qua bằng nước cất và sấy khô.

Các dụng cụ bằng kim loại, nhựa hay gỗ phải rửa sạch. Có thể khử trùng bằng phenol 5% hoặc còn 70°C , hoặc hấp ở nồi hấp áp lực, sau đó sấy khô hoặc để khô tự nhiên.

Các dụng cụ vừa mới dùng để nuôi cây VSV trước khi rửa nhất thiết phải hấp 121°C trong 30 phút. Nếu nuôi các VSV biết chắc là không gây bệnh (*Azotobacter*, *Rhizobium*, *Saccharomyces*...) thì có thể bỏ qua giai đoạn này. Dùng chổi rửa chai lọ cọ kỹ từng dụng cụ với xà phòng hoặc bột tẩy rửa.

Đối với các dụng cụ thủy tinh có dính dầu, mỡ trước khi rửa cần dùng một ít bông tẩm xylenee chùi cho sạch, rồi dùng nước xà phòng nóng để rửa. Rửa xong nên ngâm vào hỗn hợp sulfochromate một ngày rồi đem rửa lại bằng nước, tráng bằng nước cất sau đó để khô tự nhiên hay sấy khô trong lò sấy.

Dịch rửa sulfochromate được pha chế theo tỷ lệ sau:

K₂Cr₂O₇ 60 g

H₂SO₄ đậm đặc 66 ml

H₂O 1000 ml

Đem 60 g K₂Cr₂O₇ hòa vào 500 ml nước. Thêm từ từ 66 ml H₂SO₄ đậm đặc, cuối cùng lại thêm 500 ml nước nữa. Kali bichromate sẽ tác dụng với acid sulfuric và làm sinh ra acid chromic. Chất này có tác dụng oxy hóa mạnh do đó có thể tẩy sạch các vết bẩn trên dụng cụ thủy tinh. Dịch ngâm sulfochromic có thể dùng nhiều lần cho đến khi biến thành màu lục đen hãy bỏ.

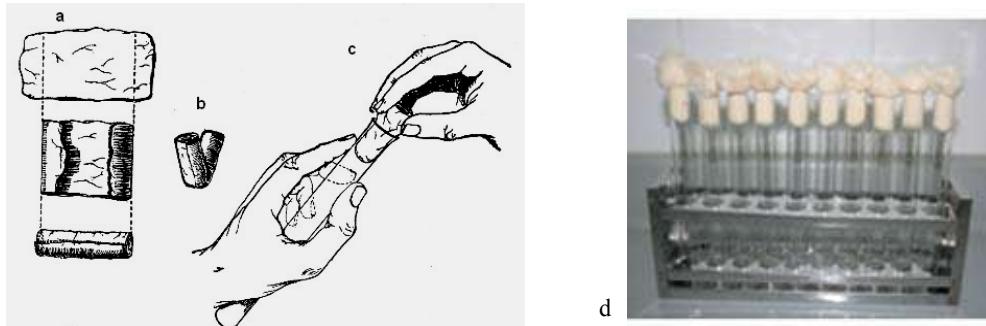
* Chế mực viết trên kính:

Hòa 1 g fuchsine kiềm vào 1 lọ có 15 ml rượu 95⁰. Bên cạnh đó hòa 2 g tannin (hay tannoid) vào 15 ml nước và đun sôi, trộn lẫn hai hỗn dịch theo tỷ lệ 1 : 1.

3.2. Bao gói dụng cụ vật liệu

Trước khi đem hấp khử trùng những dụng cụ vật liệu dùng để thí nghiệm cần phải gói kỹ, thật kín để vi khuẩn ở ngoài không thể lọt vào dụng cụ, không ảnh hưởng đến thí nghiệm.

Dùng bông loại không thấm nước để làm nút ống nghiệm, chai lọ, hay bịt đầu các ống thủy tinh.



Hình 7. Làm nút bông theo trình tự a, b, c; Ống nghiệm đậy nút bông d.

3.3. Vật liệu

Cần chuẩn bị trước các ống giống VSV thuần chủng do phòng thí nghiệm tự phân lập (xem phần phân lập VSV) hoặc các ống giống VSV chuẩn thuần chủng (có thể mua từ các trung tâm giữ giống Quốc gia). Trong các bài thực hành nên có các tập hợp VSV sau:

- Các loại cầu khuẩn: *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*; *Micrococcus ureae*, *Streptococcus lactis*...
- Các loại trực khuẩn: *Escherichia coli*; *Proteus vulgaris*; *Klebsiella pneumoniae*; *Bacillus subtilis*, *B. mycoides*; *Clostridium pasteurianum*...
- Các loại xoắn khuẩn: *Spirillum rubrum*; *Spirillum volutans*.

- Nấm men: *Sac. cerevisiae*, *Sac. ellipsoideus*; *Candida utilis*, *Candida albicans*.
- Nấm mốc: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*; *Penicillium notatum*; *Rhizopus nigricans*; *Mucor mucedo*.
- Xạ khuẩn: *Micromonospora* sp.; *Nocardia* sp.; *Streptomyces rimosus*, *Str. fradiae*...

3.4. Các dụng cụ cần thiết

- + Kính hiển vi quang học có chất lượng tốt (các vật kính, thị kính không bị nhiễm mốc, đặc biệt là vật kính dầu).
- + Lam kính (phiến kính): hình chữ nhật, kích thước (20 × 76) mm, dày khoảng 0,1 mm, dùng để mang mẫu vật soi ở kính hiển vi.
- + Lamen (lá kính): thường có hình vuông, kích thước (10 × 10) mm hoặc (22 × 22) mm, dày (0,12 – 0,14) mm, dùng để đậy mẫu vật trên lam kính.
- + Thước đo vật kính và thước đo thị kính: dùng để đo kích thước tế bào VSV.
- + Khung đếm Goriaep: dùng để kiểm tra số lượng tế bào VSV.
- + Hộp lồng (đĩa Petri): dùng để nghiên cứu các đặc điểm hình thái, đặc điểm nuôi cấy và phân lập VSV hiếu khí.
- + Bình nón: dùng để nuôi cấy, nhân giống, chứa các loại môi trường. Nó gồm nhiều loại: 100 ml, 150 ml, 250 ml, 500 ml... Được sử dụng nhiều nhất là loại bình có dung tích 250 ml.
- + Que cấy và que trang: Que cấy (gồm ba loại: đầu tròn, đầu nhọn, đầu hình móng ngựa) dùng để lấy giống, cấy truyền và làm tiêu bản vi sinh vật; que trang dùng để dàn đều giọt dịch khi phân lập vi sinh vật.
- + Chậu rửa có cầu rửa: (cầu rửa là một que thủy tinh uốn cong hình chữ U đặt trên miệng chậu, nơi đặt tiêu bản khi nhuộm màu và rửa nước).
- + Đèn cồn: bắc phải dùng bông cotton không pha nilon, khi cháy phải đều và xanh. Khi ngọn đèn đỏ phải thay bắc hoặc vắt khô bắc và nhúng vào cồn mới.

3.5. Pha chế

Pha chế các loại hóa chất, các loại thuốc nhuộm, thuốc thử, các loại môi trường dinh dưỡng (được trình bày cụ thể ở từng bài thực hành).

4. SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN KÍNH HIỂN VI

4.1. Sử dụng kính hiển vi

Vì vi sinh vật quá nhỏ bé, không thể thấy bằng mắt thường nên để quan sát được chúng người ta phải dùng nhiều loại kính hiển vi khác nhau.

Kính hiển vi quang học gồm có giá kính và hệ thống quang học. Giá kính gồm chân kính, trụ mang ống kính, bàn kính, ống kính, các ốc chuyển nhanh và chậm. Hệ thống

quang học gồm thị kính, vật kính, kính tụ quang, hệ thống đèn chiếu sáng hoặc gương phản quang (hình 8).

Dộ phóng đại của kính = độ phóng đại của vật kính × độ phóng đại của thị kính.

Ví dụ: Thị kính $\times 15$, vật kính $\times 100$ thì độ phóng đại của kính là 1.500 lần.

Hệ kính khô: Vật kính có độ phóng đại $\leq (\times 40)$.

Hệ kính dầu: thường sử dụng vật kính ($\times 90$) hoặc ($\times 100$). Khi sử dụng vật kính dầu, trước hết phải nhỏ 1 giọt dầu cede hay còn gọi là dầu soi kính hiển vi lên tiêu bản, sau đó vật kính phải được nhúng chìm trong giọt dầu để giảm sự tán sắc của ánh sáng khi nó đi qua lam kính và lamen để vào vật kính.

Để tăng hoặc giảm cường độ của ánh sáng đi vào vật kính có thể điều chỉnh màng chắn ánh sáng trên kính tụ quang kính.

* **Những điều cần chú ý khi sử dụng kính hiển vi quang học**

– Không sờ tay vào các thấu kính. Khi thấu kính bẩn, lau nhẹ bằng vải bông mềm, sạch và tránh làm xước thấu kính.

– Bỏ tiêu bản ra khỏi kính hiển vi khi đã xem xong. Lau sạch dầu dính trên vật kính bằng xylene hoặc toluene (không dùng quá nhiều xylene để lau, vừa độc hại vừa làm tan chất gắn vật kính). Tuyệt đối không được dùng cồn, vì nó làm tan chất gắn các thấu kính của vật kính.

– Để tránh làm hỏng kính hiển vi: không xoay các ốc điều chỉnh quá nhanh và mạnh, nhất là các bộ phận quang học.

– Không chạm mạnh thấu kính của vật kính lên tiêu bản để tránh xước.

– Không thay các vật kính từ kính hiển vi này sang kính khác. Nếu phát hiện có một hư hỏng nào đó, nhất thiết không được tự ý tháo thấu kính ra sửa chữa mà phải báo cáo với cán bộ hướng dẫn biết để xử lý.

* **Cách sử dụng kính hiển vi**

+ Xem tiêu bản ở hệ kính khô

– Đặt tiêu bản lên bàn kính, sau đó đưa vật kính có độ phóng đại nhỏ ($\times 10, \times 20$) gần sát vào tiêu bản, vừa nhìn qua thị kính vừa điều chỉnh ốc thô, từ từ nâng vật kính lên cho tới khi nhìn thấy vùng VSV trong tiêu bản.

- Khi đã xác định được vị trí cần xem, đổi vật kính sang độ phóng đại lớn hơn ($\times 40, \times 60$), sau đó điều chỉnh ốc tinh để thấy rõ hình ảnh VSV.

+ Xem tiêu bản ở hệ kính dầu

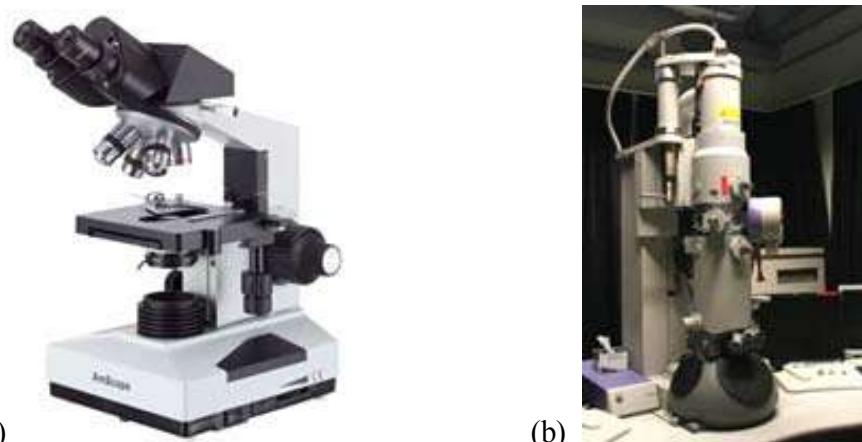
– Đầu tiên cũng dùng vật kính có độ phóng đại nhỏ để xác định vị trí cần tìm trên tiêu bản như phần trên. Sau đó nhỏ một giọt dầu cede lên tiêu bản.

– Đổi vật kính sang độ phóng đại lớn ($\times 100, \times 100$), nhưng đầu vật kính chìm vào giọt dầu. Khẽ điều chỉnh ốc tinh để tìm thấy hình ảnh của VSV khi vật kính vẫn chìm trong giọt dầu. Đầu có độ chiết quang giống thủy tinh nên tạo môi trường đồng nhất, ánh sáng không bị khúc xạ đi qua môi trường này.

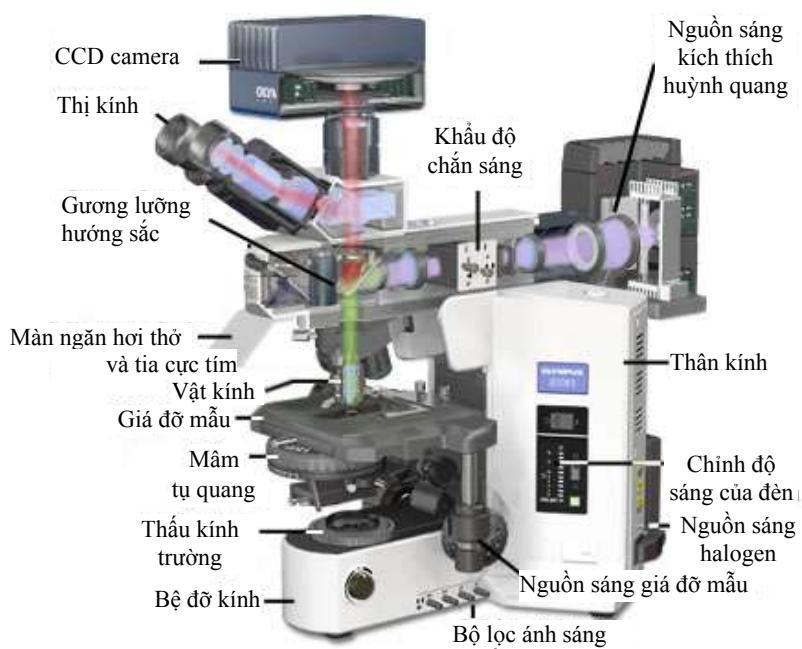
Kính hiển vi điện tử: Dùng chùm tia điện tử với độ phân giải cao thay cho ánh sáng thường cho phép nhìn thấy ảnh của mẫu vật được phóng đại từ 30 đến 50 vạn lần.

Kính hiển vi huỳnh quang: Dùng chùm tia tử ngoại chiếu vào tiêu bản đã nhuộm màu bởi các chất huỳnh quang. Trong tế bào, các cấu trúc khác nhau sẽ phát quang với màu sắc khác nhau cho phép ta phân biệt rõ chúng.

4.2. Bảo quản kính hiển vi



a – Kính hiển vi quang học (SKU: V-B490) b – Kính hiển vi điện tử (Philips-TEM)



c – Kính hiển vi huỳnh quang

Hình 8. Kính hiển vi.

Sau khi quan sát xong, ta dùng ốc điều chỉnh nhanh nâng vật kính lên cao, rồi lấy tiêu bản ra.

– Nếu dùng vật kính dầu thì trước tiên dùng khăn mềm lau sạch dầu. Sau đó dùng bông thấm xylene lau lại thật sạch, rồi nhẹ nhàng lau khô vật kính, tránh xát mạnh làm cho thấu kính bị xay xát. Dùng ốc chuyển nhanh hạ kính về trạng thái nghỉ rồi cất kính vào hộp hay chuông thủy tinh có sẵn gói vôi cục hay silicagen hút ẩm.

– Phải giữ kính ở nơi khô ráo, sạch sẽ để tránh ống kính bị hư hại do bụi hoặc mốc.

– Khi vận chuyển kính phải thận trọng, tay phải cầm thân kính, tay trái đón dưới đế kính, tránh đổ vỡ.

Phân 2. HƯỚNG DẪN THỰC HÀNH

Bài 1. LÀM TIÊU BẢN VÀ NHUỘM TẾ BÀO VI SINH VẬT

I. NGUYÊN LÝ

Để quan sát được VSV ta phải biết cách làm tiêu bản. Tùy thuộc đới tượng nghiên cứu là vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc hay nấm men... mà có cách làm các dạng tiêu bản khác nhau. Có hai dạng tiêu bản phổ biến là tiêu bản tạm thời và tiêu bản cố định nhuộm màu.

Các tiêu bản tạm thời (tế bào còn sống) như tiêu bản giọt ép được sử dụng để xác định hình dạng, sự sắp xếp các tế bào cũng như khả năng di động, tiêu bản “ép lam” chỉ dùng để nghiên cứu sự sắp xếp của tế bào một cách tự nhiên trong khuẩn lạc, như hình dạng chuỗi bào tử và cách sắp xếp cuồng bào tử ở xạ khuẩn hay nấm mốc.

Các tiêu bản cố định (tế bào chết) rất thuận tiện vì giữ được lâu, được sử dụng để phát hiện các đặc điểm hình thái, cấu trúc và đếm số lượng VSV.

Khi sử dụng ngọn lửa đèn cồn (hay đèn ga) phải điều chỉnh sao cho không có khói. Chỗ nóng nhất của ngọn lửa đèn cồn là phần ngọn lửa xanh.

Có nhiều phương pháp cố định tiêu bản như nhỏ lên vết bôi 1 – 2 giọt cồn 96⁰, đốt cháy và dập tắt ngay (khoảng 30 giây) hay cố định tiêu bản bằng hóa chất: ngâm tiêu bản trong acetone 5 phút, trong dung dịch 40% formaline vài giây...

Tế bào VSV gần như là không màu, do đó quan sát bằng phương pháp xem trực tiếp rất khó, vì vậy cần phải làm tiêu bản rồi đem nhuộm màu. Nhuộm VSV có bốn mục đích:

- Để nghiên cứu hình thái, cấu tạo đặc biệt của VSV như màng nhày, bào tử...
- Để phân loại VSV căn cứ vào tính chất bắt màu Gram, tính kháng cồn, kháng acid.
- Để dễ có thể phân biệt và quan sát được các vi cấu tạo trong tế bào VSV.
- Để lưu giữ tiêu bản trong một thời gian, để chụp ảnh hiển vi.

II. THỰC HÀNH

1. Mục đích yêu cầu

Biết cách làm tiêu bản và sử dụng kính hiển vi, kính lúp để phân biệt, nhận diện hình thái, cấu tạo, cơ quan sinh sản của vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc thường gặp trong một số cơ chất tự nhiên và trên môi trường nuôi cây.

Nắm vững các phương pháp nhuộm và phân biệt vi khuẩn Gram dương, Gram âm.

2. Mẫu vật, dụng cụ, hóa chất

2.1. Mẫu vật

Để buổi thực hành đạt kết quả tốt, cần chuẩn bị:

- Nguyên liệu chứa vi sinh vật:

- + Rác thải hữu cơ đang bị phân hủy 200 g, đất 100 g, trái cây bị thối và mốc 200 g, nước thải 500 ml, thực phẩm hỏng 200 g.

- + Bánh men rượu 5 bánh, men bột Pháp (*S.cerevisiae*) 20 g

- Các chủng vi sinh vật hiện có của phòng thí nghiệm:

- + Tụ cầu khuẩn *Staphylococcus aureus*.

- + Trực khuẩn: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bact.prodigiosum*, *Pseudomonas aeruginosa*.

- + Trực khuẩn sinh bào tử: *Bacillus mesentericus*, *Clostridium pasteurianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*. Xoán khuẩn: *Rhodospirillum rubrum*

- + Nám men: *Saccharomyces cerevisiae*

- + Vi nấm: *Penicillium notatum*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus oryzae*

- + Xạ khuẩn: *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces cylindrosporum*

Có thể cây truyền vi khuẩn trên môi trường thạch – thịt – peptone (MPA), nấm men trên môi trường Hansen, nấm mốc trên môi trường Czapek, xạ khuẩn trên môi trường Gause – 1 hay Czapek – Tinh bột.

2.2. Dụng cụ: Lam kính (phiến kính) và lamen (lá kính)

Muốn làm tiêu bản VSV, cần có lam kính và *lamen* đúng quy cách và thật sạch. Lam kính thường có kích thước (70×26) mm và dày ($1,1 - 1,4$) mm. La men thường có kích thước (18×18) mm và có chiều dày không quá ($0,15 - 0,17$) mm. Các lam kính và *lamen* cần làm sạch. Để làm tiêu bản giọt treo người ta dùng một lam kính có lỗ lõm ở giữa.

2.3. Hóa chất

Cách pha chế một số loại thuốc nhuộm cho bài 1:

1) Dung dịch fuchsine kiểm

Công thức:

Fuchsine kiềm 1 g Cồn nguyên chất 96° 10ml

Acid phenic kết tinh 5 g Nước cất 100 ml

Cách pha: Nghiền fuchsine với 5ml cồn trong cối sạch, quấy đều, đổ từ từ 2/3 lượng nước vào, quấy đều, xong cho thêm acid phenic, trộn đều cho vào lọ kín để 24 giờ, đem lọc qua giấy, thu được dung dịch fuchsine đặc, khi dùng nhuộm đơn hoặc nhuộm Gram thì đem pha loãng dung dịch này gấp 10 lần với dung dịch acid phenic 5%.

Dung dich fuchsine 10 ml

Dung dich acid phenic 5% 90 ml

2) Pha dung dịch xanh methylene

Công thức:

Xanh methylene 1 g

Còn nguyên chất 960 10 ml

Cách pha: giống như fuchsine ở trên.

Acid phenic kết tinh 1 g

Nước cất 10 ml

3) Pha dung dịch lactophenol để thấm ướt sợi nấm

Công thức:

Acid lactic 10 g

Nước cất 10 ml

Glycerol 20 g

Acid phenic (phenol) 10 g

Cách pha: Đầu tiên trộn acid lactic, phenol và nước lắc đều, sau đó thêm phenol. Lúc mới pha dung dịch không màu sau đó chuyển sang màu nâu nhạt. Giữ trong lọ màu.

4) Pha dung dịch lugol

Công thức:

Kali iodua (KI) 1 g

Nước cất 150 ml

Iod tinh thể (I) 0,5 g

Cách pha:

Nghiền kali iodua – KI với một ít nước cất, sau đó cho Iod tinh thể đã tán nhỏ vào lắc cho tan hết, cuối cùng cho đủ nước cất, lắc đều, để 24 giờ rồi đem lọc, đựng vào chai màu. Không nên pha nhiều vì dễ bị biến chất.

5) Pha dung dịch tẩy màu còn acetone

Còn nguyên chất 5 phần, acetone 1 phần.

Nếu không có acetone thì dùng còn nguyên chất hoặc 90° cũng được.

6) Pha dung dịch thuốc nhuộm bào tử

– Dung dịch lục malachite ($C_{23}H_{25}N_2Cl$) bão hòa trong ethanol 95°, khay cho tan, sau đó đổ thuốc nhuộm vào lọ thủy tinh màu tối có nút mài.

– Dung dịch safranin O ($C_{20}H_{19}N_4Cl = 350,80$) 0,5% (hòa tan 5 g safranin O trong 100 ml còn ethanol 95°), trước khi dùng pha với nước cất theo tỷ lệ 1:5 (vol/vol) để có dung dịch 0,5%. Hoặc chuẩn bị sẵn dung dịch fuchsine ziehl: fuchsine kiềm ($C_{19}H_{18}N_3Cl = 323,82$) 1 g, phenol 5 g, ethanol, 90% 10 ml, nước cất 200 ml (hòa tan fuchsine với ethanol; hòa tan phenol với nước cất sau đó trộn lại).

3. Các bước tiến hành

3.1. Làm tiêu bản vi sinh vật

3.1.1. Làm tiêu bản vi sinh vật sống không nhuộm màu

a) Phương pháp làm tiêu bản giọt treo

Loại tiêu bản này dùng để theo dõi sự sinh sản, sự sắp xếp tế bào, sự nảy mầm, sự di động... của VSV. Khi quan sát VSV bằng tiêu bản giọt treo cần cường độ chiếu sáng ít hơn bình thường (đóng bớt màn chắn ánh sáng trên tụ quang kính).

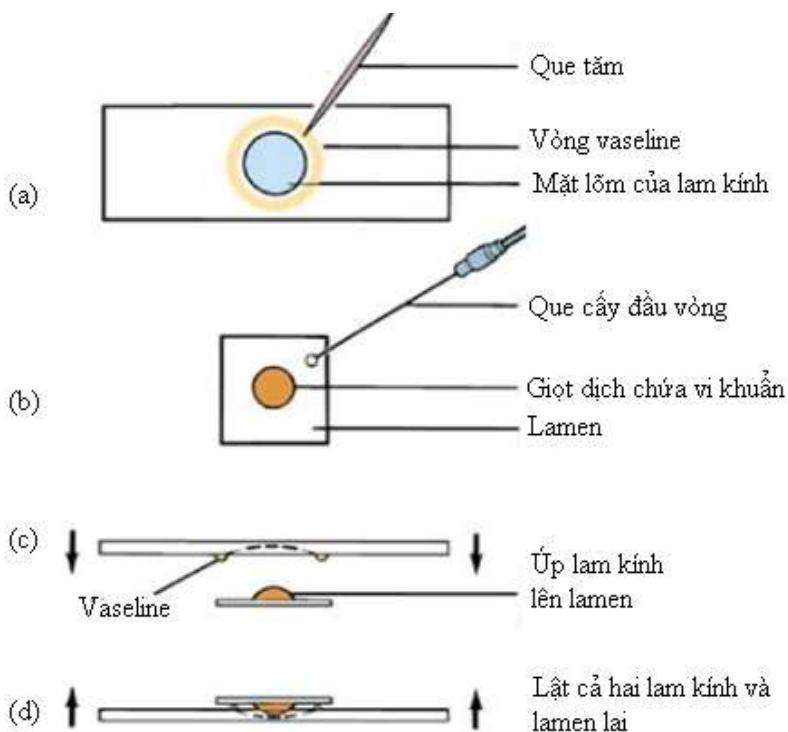
Cách tiến hành:

– Dùng que cây hoặc pipette nhỏ một giọt dịch huyền phù vi sinh vật (khoảng 10 – 20 µl) lên mặt lamen sạch vô trùng. Lật ngược lamen sao cho giọt dịch huyền phù VSV treo ở mặt dưới lamen.

– Úp lamen vào lam kính đặc biệt có phần lõm hình cầu ở giữa, quanh lỗ đã được bôi vaseline. Lúc này ta được giọt dịch huyền phù vi sinh vật treo lơ lửng trong khoang kính do lamen và lam kính lõm tạo ra.

Chú ý:

- Không để giọt canh trường lan rộng hay chạm vào đáy của phần lõm.
- Nếu cần theo dõi các vi sinh vật trong giọt treo nhiều ngày thì pha dịch huyền phù vi sinh vật bằng môi trường dinh dưỡng vô trùng.
- Tất cả các thao tác làm tiêu bản phải được tiến hành trong điều kiện vô trùng gần ngọn lửa đèn còn như đã hướng dẫn.



Hình 9. Cách làm tiêu bản giọt treo (Prescot, et al., 2002).

b) Phương pháp làm tiêu bản giọt ép

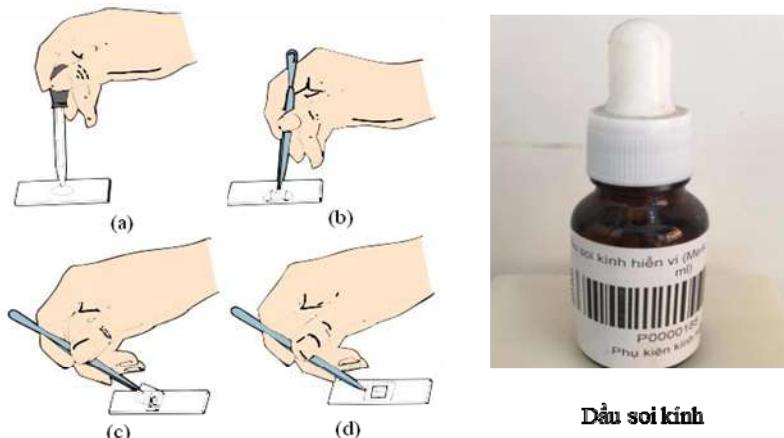
Chuẩn bị mẫu: Dịch đất hạy dịch rác thải đang phân hủy, nước thải công rãnh
Tiến hành theo các bước:

- Đặt một giọt nước vào lam kính;
- Dùng ống hút nhỏ 1 giọt dịch VSV đã pha loãng đặt vào giọt nước;

– Đe một mép lamen tiếp xúc với lam kính rồi nhẹ nhàng hạ lamen xuống, tránh tạo bọt khí;

– Thấm nhẹ lớp dịch trào ra xung quanh bằng giấy thấm.

Quan sát tiêu bản ở hệ kính khô ($\times 10$; $\times 20$; $\times 40$). Nếu cần soi ở hệ kính dầu thì nhỏ lên lamen một giọt dầu cede. Vật kính soi dầu thường có đường viền đỏ ($\times 100$).



Hình 10. Các bước làm tiêu bản giọt ép (Prescot, et al., 2002).

a – Đặt một giọt nước vào lam kính; b – Cho mẫu vật vào giọt nước hòa đều;

c – Đặt lamen nằm nghiêng chạm cạnh giọt dịch; d – Từ từ hạ thấp lamen sao cho không tạo bong bóng khí.

c) Phương pháp làm tiêu bản xé rãnh thạch

Dùng để quan sát hệ sợi và cuống sinh bào tử của nấm sợi hoặc xạ khuẩn.

– Cấy bào tử hay hệ sợi của vi sinh vật lên môi trường dinh dưỡng đặc trong đĩa Petri bằng phương pháp cấy ziczac, hoặc trải dày bằng que trang.

– Dùng dao vô trùng xé một rãnh thạch trong đĩa Petri.

– Đặt lamen vô trùng lên bờ của rãnh thạch vừa xé.

– Đậy đĩa Petri và để vào tủ âm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.

Có thể cải tiến phương pháp trên như sau: sau khi cấy vi sinh vật có hệ sợi lên bề mặt môi trường, cắm chéo góc 45° một lamen vô trùng vào mặt thạch.

Lật ngược và đặt đĩa Petri vào tủ âm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.

3.1.2. Làm tiêu bản cố định nhuộm màu

Tiêu bản cố định được sử dụng rất phổ biến để phát hiện hàng loạt các đặc điểm hình thái và đếm số lượng vi sinh vật. Những tiêu bản này rất thuận tiện vì có thể giữ được lâu. Xem các tiêu bản cố định bằng các vật kính khô hay vật kính dầu.

Làm tiêu bản cố định theo các bước sau:

a) *Làm vết bôi*: Có thể làm vết bôi theo một trong hai cách:

Cách 1: Dùng que cấy lấy một vòng que cấy dịch nuôi cấy VSV (vi khuẩn hay nấm men) dàn trên lam kính (khoảng 2 cm^2).

Cách 2: Đặt một giọt nước cát vô trùng vào giữa lam kính sạch, dùng que cây lấy một ít VSV từ khuẩn lạc hay dịch nuôi rồi dàn mỏng giọt huyền phù đó trên lam kính.

b) Làm khô vết bôi: Dùng kẹp giữ lam kính sao cho vết bôi khô tự nhiên hay hơi nhẹ trên ngọn lửa đèn cồn. Lấy lam kính áp lên mu bàn tay thấy nóng vừa là được, không làm lam kính quá nóng, VSV sẽ biến dạng.

c) Cố định vết bôi: Nhổ lên vết bôi 1 – 2 giọt cồn 96⁰. Đốt cháy và dập tắt ngay (khoảng 30 giây).

Cố định vết bôi nhằm ba mục đích:

- Giết chết vi sinh vật;
- Gắn chặt vi sinh vật vào lam kính;
- Làm vết bôi bắt màu tốt hơn vì các tế bào chết bắt màu tốt hơn các tế bào sống.

Sau khi cố định, nếu mật độ tế bào vừa phải, vết bôi có màu trắng nhạt. Nếu vết bôi trắng quá có nghĩa là mật độ tế bào dày đặc, cần phải làm lại. Chú ý hơi quá nóng tế bào dễ bị biến dạng.

Chú ý: Nên hạn chế và tránh dùng các VSV gây bệnh như *Vibrio cholerae* (gây bệnh tả), *Clostridium botulinum* (trực khuẩn ngộ độc thịt), *Pseudomonas aeruginosa* (trực khuẩn mủ xanh).

3.2. Phương pháp nhuộm đơn

a) Chủng vi sinh vật: *E.coli*, *Bacillus*, *S.cerevisiae* chuẩn bị trước 48 giờ.

b) Các bước nhuộm đơn:

- Đặt tiêu bản cố định lên cầu rửa.
- Đặt một miếng giấy lọc lên vết bôi (nếu thuốc nhuộm sạch cẩn thận thì không cần).
- Nhổ vài giọt thuốc nhuộm (fuchsine kiềm hoặc xanh methylene hay lugol) lên trên giấy lọc, để 1 – 3 phút.
- Rửa nước, để vòi nước từ từ chảy xuống một đầu lam kính cầm hơi nghiêng đến khi nước trong là được.
- Để tiêu bản khô tự nhiên hoặc dùng giấy thấm lọc thấm cẩn thận.

c) Quan sát vi sinh vật: Đặt tiêu bản lên bàn kính, quan sát trên kính hiển vi với vật kính khô ($\times 40$) và vật kính dầu ($\times 100$).

d) Kết quả: Nếu nhuộm và rửa tốt, thị trường của kính hiển vi sạch và sáng, chỉ có tế bào VSV được nhuộm màu.

3.3. Quan sát vi sinh vật

Làm tiêu bản cố định, nhuộm đơn để quan sát và phân biệt: vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men và nấm mốc ở vật kính khô ($\times 40$) và vật kính dầu ($\times 100$).

3.3.1. Quan sát vi khuẩn

Vi khuẩn có cấu tạo đơn bào. Chúng có dạng hình cầu, hình que, hình xoắn, hình dấu phẩy... Các tế bào có thể đứng riêng rẽ, kết thành từng đôi, thành chuỗi hay thành chùm.

Vi khuẩn sinh sản chủ yếu theo hình thức phân đôi. Một số vi khuẩn có khả năng di động nhờ roi.

Thường người ta làm tiêu bản quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào sinh dưỡng vi khuẩn sau khi nuôi cấy chúng ở môi trường thích hợp, nhiệt độ 30 – 37 °C sau 24 – 48 giờ.

a) Các đặc trưng sinh học cần quan sát ở vi khuẩn bằng kính hiển vi quang học

- Các kiểu hình dạng tế bào, khả năng di động (roi), các dạng bào tử.

b) Cách quan sát

Tùy theo điều kiện phòng thí nghiệm, có thể chọn đại diện từng nhóm.

– Quan sát cầu khuẩn: Sử dụng *Sarcina lutea*, *Streptococcus lactis* hay *Staphylococcus aureus*.

Thường người ta làm tiêu bản quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào sinh dưỡng vi khuẩn sau khi nuôi cấy chúng ở môi trường thích hợp, nhiệt độ 30 – 37 °C sau 24 – 48 giờ.

- Các đặc trưng sinh học cần quan sát ở vi khuẩn bằng kính hiển vi quang học:

Các kiểu hình dạng tế bào, khả năng di động (roi), các dạng bào tử.

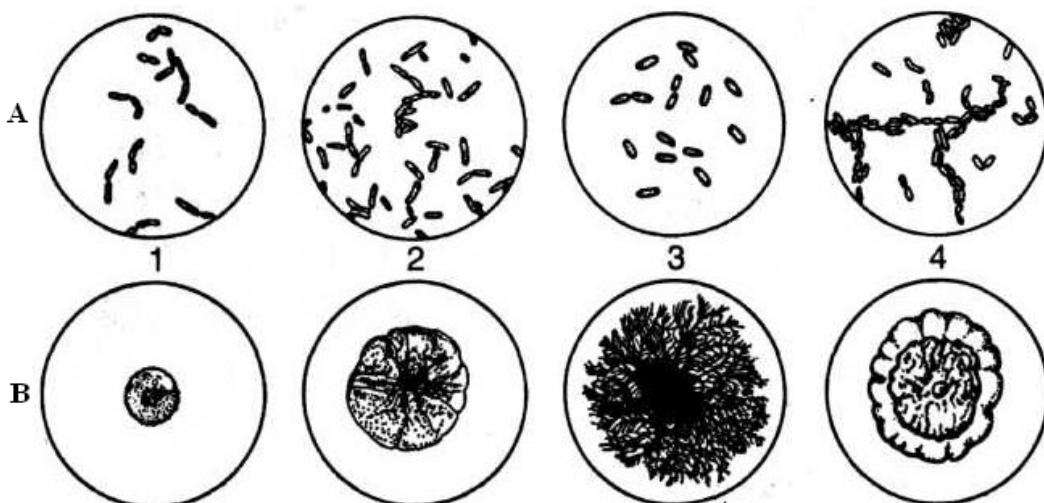
– Cách quan sát: Tùy theo điều kiện PTN có thể chọn đại diện từng nhóm:

+ Quan sát cầu khuẩn: Sử dụng dịch pha loãng sữa chua.

+ Quan sát các trực khuẩn: Dùng nước mắm bị thối...

+ Quan sát các xoắn khuẩn: Lấy tăm bông vô trùng thấm nước phết vào bụa răng.

Làm tiêu bản giọt ép: Lấy một giọt nước dưa chua cho lên lam kính, sau đó làm tiêu bản cố định, nhuộm đơn. Quan sát ở vật kính ($\times 40$) và ($\times 100$).



Hình 11. Hình dạng vi khuẩn chi *Bacillus* thường gặp trong chất thải hữu cơ.

A – Tế bào sinh dưỡng; B – Khuẩn lạc.

(1 – *B. megaterium*; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. mycoides*; 4 – *B. mesentericus*)

3.3.2. Quan sát xạ khuẩn (vi khuẩn hình sợi)

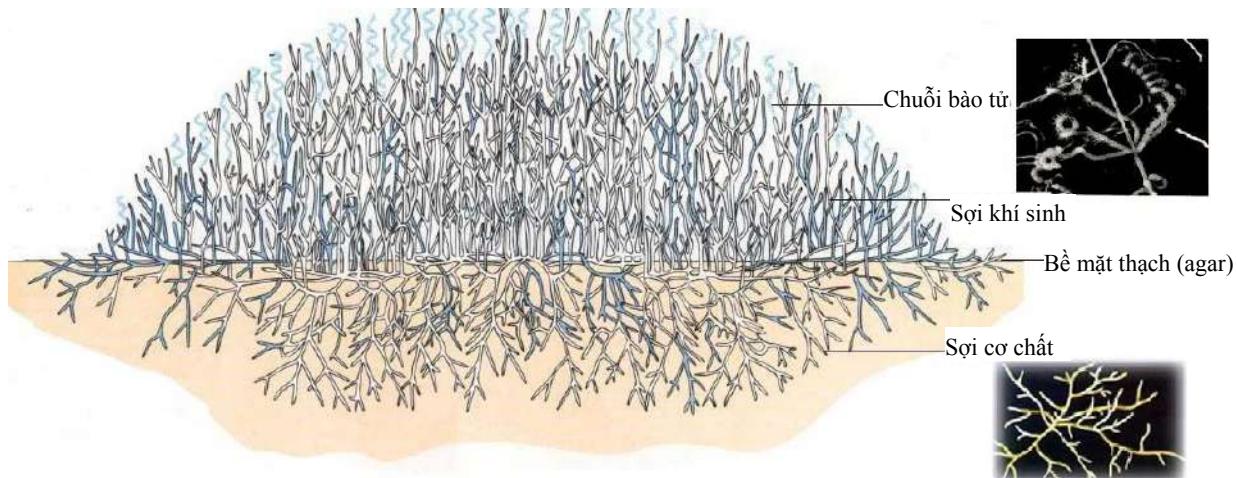
Những vi khuẩn thuộc bộ Actinomycetales là những vi khuẩn hình sợi Gram dương, (sợi gọi là khuẩn ty) có thể phân nhánh, thường gặp chúng trong môi trường đất và nước.

Đặc điểm nổi bật của xạ khuẩn là có hệ sợi (khuẩn ty thể) rất phát triển, phân nhánh và không có vách ngăn, kích thước khoảng $1,0 - 1,5 \mu\text{m}$ (nhỏ hơn nhiều so với đường kính sợi nấm $7 - 9 \mu\text{m}$). Xạ khuẩn cũng như vi khuẩn chưa có nhân được bao bọc bằng màng (cùng thuộc nhóm nhân sơ), thành tế bào xạ khuẩn không chứa cellulose hay chitin mà chứa hợp chất điển hình của vi khuẩn là glucopeptid. Xạ khuẩn có hai loại hệ sợi:

- Hệ sợi cơ chất bám sâu vào môi trường dinh dưỡng đặc (hình 12).
- Hệ sợi khí sinh, mọc vươn lên khỏi mặt thạch và hình thành cuống sinh bào tử.

Hình dạng và cấu tạo cuống sinh bào tử (dạng thẳng, xoắn, lò xo, lượn sóng, móc đơn, móc kép hay móc vòng...), hình dạng bào tử và cách sắp xếp chuỗi bào tử hình cầu, bầu dục... có bề mặt nhẵn hay có gai là một trong những đặc điểm để phân loại xạ khuẩn.

a) Các đặc điểm đặc trưng của xạ khuẩn cần quan sát



Hình 12. Xạ khuẩn đang mọc trên môi trường thạch (lát cắt ngang của một khuẩn lạc cho thấy chuỗi bào tử, sợi khí sinh và sợi cơ chất).

(Chỉnh sửa bởi Angel Catala, ISBN 978-953-51-3580, 2017).

– Hệ sợi khí sinh và hệ sợi cơ chất, màu sắc lớp khuẩn ty khí sinh và cơ chất, sắc tố tiết ra môi trường.

– Hình dạng bào tử và kết cấu cuống sinh bào tử; chuỗi bào tử, bè mặt bào tử (nhẵn, gai lông, xù xì...).

b) Cách quan sát

Lấy lamen có xạ khuẩn mọc từ tiêu bản xé rãnh thạch hay cắm lamen nghiêng đặt lên lam kính. Nhỏ lên tiêu bản 1 – 2 giọt lactophenol sau đó soi ở vật kính ($\times 40$).

3.3.3. Quan sát nấm men

Nấm men có cấu tạo đơn bào, không chuyển động. Tế bào có dạng hình cầu, hình trứng, hình bầu dục. Kích thước trung bình của nấm men là $(3 - 5) \times (5 - 10)$ μm . Một số loài nấm men sau khi phân cắt bằng phương pháp nảy chồi, tế bào con không rời khỏi tế bào mẹ và lại tiếp tục mọc chồi. Bởi vậy nó có hình thái như cây xương rồng (gọi là giả khuẩn ty) khi quan sát dưới kính hiển vi.

a) Các đặc trưng sinh học cần quan sát ở nấm men

- Hình thái, kích thước tế bào nấm men.
- Sự nảy chồi của nấm men.
- Hình dạng, số lượng bào tử trong một túi.

b) Cách quan sát

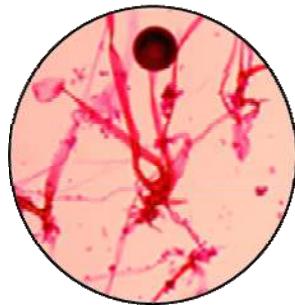
Hình dạng tế bào và kiểu sinh sản nảy chồi của nấm men rất dễ quan sát bằng phương pháp làm tiêu bản cố định. Nhưng muốn quan sát được bào tử túi ở *Saccharomyces* phải cấy nấm men trên môi trường Hansen trong 2 – 3 tuần. Sau đó chuẩn bị vết bôi trên lam kính, nhuộm tiêu bản bằng phương pháp nhuộm bào tử của Alice B. Schaeffer và MacDonald Fulton hay theo phương pháp Peskrop. M.A. Tế bào chất bắt màu đỏ hồng, bào tử bắt màu xanh.

3.3.4. Quan sát nấm sợi (hay nấm mốc)

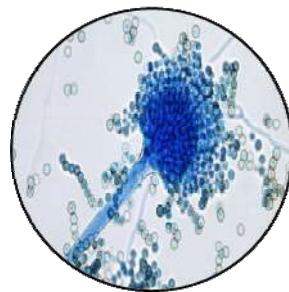
Nấm sợi (hay nấm mốc) là tên chung để chỉ nhóm vi nấm có cấu tạo sợi (khuẩn ty) phân nhánh, có vách ngăn hay không có vách ngăn tùy từng loài. Nấm sợi có hai loại bào tử: bào tử vô tính và bào tử hữu tính. Sự hình thành bào tử của chúng rất khác nhau và đặc trưng cho từng loài.

a) Các đặc điểm đặc trưng cần quan sát

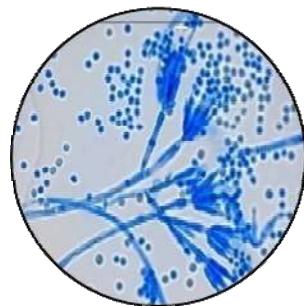
- Đặc điểm của sợi nấm (khuẩn ty): màu sắc, có vách ngăn hay không có vách ngăn.
- Đặc điểm cơ quan sinh sản: hình dạng, cách sắp xếp các bộ phận cơ quan sinh sản.
- Hình dạng, cấu tạo và cách sắp xếp bào tử (hình 13).



(a) *Rhizopus sp.*



(b) *Aspergillus sp.*



(c) *Penicillium sp.*

Hình 13. Một số loài vi nấm.

b) *Cách quan sát:*

– *Làm tiêu bản nấm sợi không nhuộm màu:*

+ Nhỏ 1 giọt dung dịch lactophenol lên lam kính.

+ Dùng que cấy lấy 1 ít khuẩn lạc nấm *Penicillium* sp. hoặc *Aspergillus* sp. dàn lên giọt lactophenol.

+ Đậy lamen, quan sát tiêu bản trên kính hiển vi ở vật kính ($\times 10$), ($\times 40$).

Vẽ hình và nhận xét về hình dạng của sợi nấm, bào tử... quan sát được.

– *Làm tiêu bản nấm sợi nhuộm màu:*

+ Nhỏ 1 giọt dung dịch lactophenol xanh cotton (lactophenol cotton blue fluid) lên lam kính.

+ Lấy một ít sợi nấm *Penicillium* sp. hoặc *Aspergillus* sp. dàn lên lam kính.

+ Đậy lamen nhẹ nhàng lên giọt dịch trên, tránh tạo bọt khí.

+ Thấm nhẹ lớp dịch trào ra xung quanh lamen bằng giấy thấm.

+ Quan sát tiêu bản ở hệ kính khô ($\times 15$), ($\times 40$).

3.4. Phương pháp nhuộm Gram

Nhuộm Gram là phương pháp nhuộm để phân biệt hai nhóm vi khuẩn Gram dương và Gram âm do Christian Gram (Đan Mạch) đề xướng năm 1884.

Chuẩn bị các vi khuẩn *Bacillus subtilis* Gram dương, *Escherichia coli* Gram âm chuẩn và các ống nghiệm có vi khuẩn nghiên cứu chưa rõ Gram âm hay dương có độ tuổi 18 – 24 giờ nuôi cấy ở môi trường thạch hay môi trường dịch thể.

a) *Nguyên tắc*

Dựa trên khả năng bắt màu của tế bào chất và thành tế bào với thuốc nhuộm crystal violet và lugol mà hình thành nên hai loại phức chất khác nhau.

+ Loại phức chất thứ nhất không cho alcohol thẩm thấu qua vẫn giữ nguyên màu tím. VSV có phức chất này thuộc loại Gram dương.

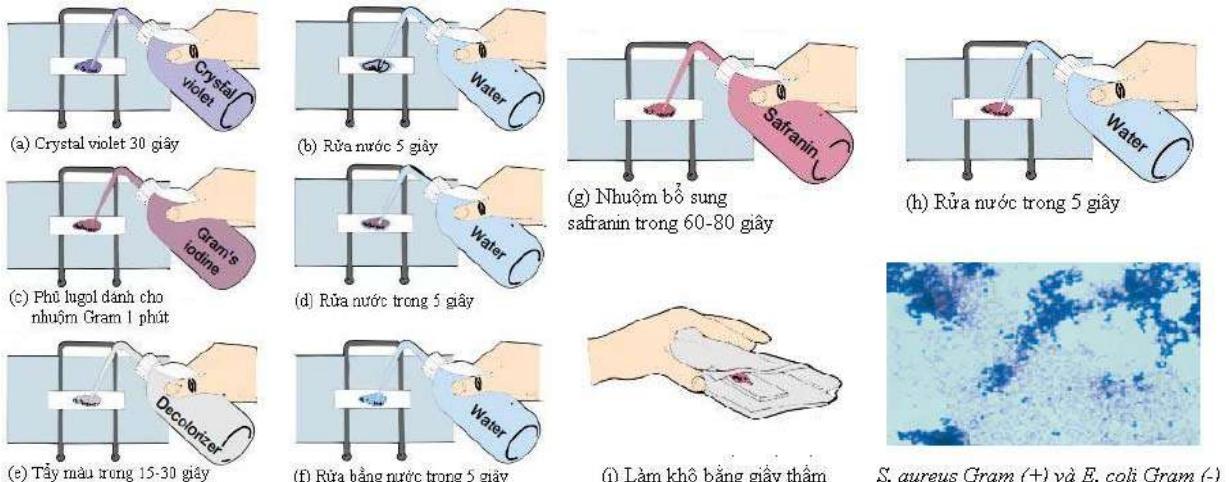
+ Loại thứ hai không bền bị alcohol thẩm thấu qua làm mất màu và bắt màu thuốc nhuộm bổ sung. Vi sinh vật có phức chất này thuộc loại Gram âm.

b) *Cách nhuộm*

– Chuẩn bị: Làm hai vết bôi trên cùng một lam kính: vết trái là hỗn hợp vi khuẩn *B. subtilis* – Gram dương và vi khuẩn *E. Coli* – Gram âm, vết bên phải là vi khuẩn chưa rõ Gram dương hay âm.

– Cố định tiêu bản bằng cách hơ qua lại trên ngọn lửa đèn cồn (sao cho vi khuẩn gắn chặt vào lam kính), nhỏ lên các vết bôi 1 – 2 giọt cồn đốt rồi đốt cháy ngay trong khoảng 30 giây.

– Các bước nhuộm Gram theo hình 14:



Hình 14. Các bước tiến hành nhuộm Gram và ví dụ minh họa kết quả.

(Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002).

- + Nhuộm bằng dung dịch crystal gentian và giữ trong 30 giây → Rửa nước 5 giây.
- + Nhuộm bằng dung dịch lugol dành cho nhuộm Gram 1 phút → Rửa nước trong 5 giây.
- + Tẩy màu bằng cồn 96⁰ hay dung dịch aceton cồn trong 30 giây → Rửa bằng nước trong 5 giây.
- + Nhuộm bỗ sung Safranin hay Fuchsine trong 60 – 80 giây → Rửa nước trong 5 giây.
- + Thâm khô và soi tiêu bản với vật kính dầu ($\times 100$).

c) Kết quả

Khi nhuộm đúng *B.subtilis* có màu tím, *E. coli* có màu hồng đỏ, từ đó có thể định loại được VSV đang nghiên cứu là Gram dương hay Gram âm, dựa vào sự bắt màu của vi sinh vật đó.

3.5. Nhuộm nội bào tử của vi khuẩn

a) Nguyên tắc

Khi dùng thuốc nhuộm có hoạt tính mạnh lục malachite với tiêu bản có đun nóng, thuốc nhuộm xâm nhập vào nội bào tử và làm chúng nhuộm màu lục. Khi rửa vết bôi bằng nước cắt các tế bào sinh dưỡng sẽ bị mất màu còn bào tử vẫn giữ lại màu lục. Khi nhuộm bỗ sung bằng đỏ safranin hay fuchsine sẽ làm phần bao quanh bào tử bắt màu phân biệt (màu đỏ hồng).

b) Chủng giống vi sinh vật và dụng cụ:

– Các loài vi khuẩn: *Bacillus subtilis* (nuôi trên MT nước thịt – peptone trước 24 giờ); *Clostridium pasteurianum* (nuôi trên MT Ashby dịch thê trước 5 – 7 ngày) và vi khuẩn mới phân lập hoặc mẫu sinh thiết bị nghi ngờ vi khuẩn có nội bào tử.

* Những vi khuẩn có nội bào tử gồm nhiều loài thuộc các chi *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Thermoactinomyces*.

- Lam kính (*slide*), kính hiển vi quang học nền sáng, dầu soi kính.
- Đèn cồn, nước cất, que cây dầu vòng, giấy lọc, cốc chia vạch loại 500 ml, giá đỡ, chậu rửa, bếp điện, kính hiển vi.

c) *Cách nhuộm nội bào tử theo phương pháp của (phương pháp Schaeffer-Fulton)*

Thứ nhất: Phát hiện và quan sát nội bào tử trong tế bào sống.

- Làm tiêu bản giọt ép với vi khuẩn *Bacillus subtilis* hay *Clostridium pasteurianum*.
- Quan sát: Bào tử có độ chiết quang cao, vì vậy khi nhìn dưới kính hiển vi nội bào tử có hình cầu hay hình trái xoan, sáng hơn các phần xung quanh.

- Thứ hai: Nhuộm nội bào tử vi khuẩn.

Bước 1: Làm vết bôi và cố định tiêu bản

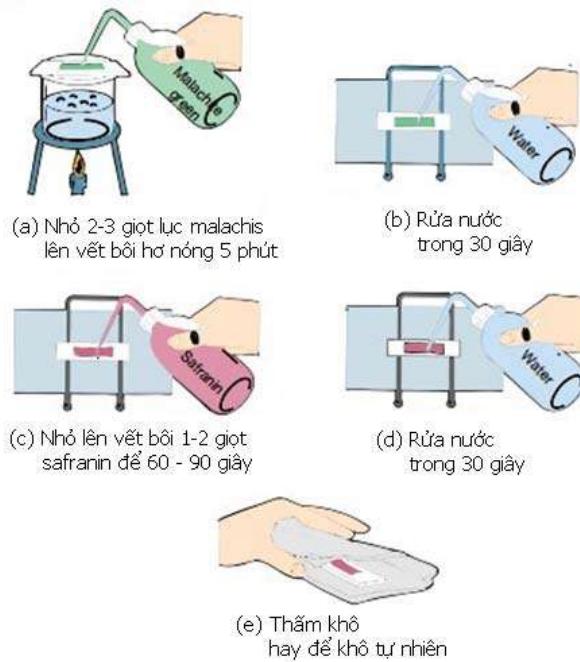
- + Dùng que cây vô trùng lấy một ít vi khuẩn *Bacillus subtilis* hay *Clostridium pasteurianum* hòa vào 1 giọt nước cất ở giữa lam kính, làm khô trong không khí, có thể hơ nhanh vết bôi trên ngọn lửa đèn cồn 2 – 3 lần để gắn chặt vi khuẩn vào lam kính.

+ Cố định vết bôi bằng cách nhỏ lên vết bôi 1 – 2 giọt cồn 95°. Đốt cháy và dập tắt ngay khoảng 30 giây.

+ Đặt tiêu bản lên trên giá đỡ, giá đỡ đặt trên cốc chia vạch loại 500 ml có chứa một ít nước đang đun nóng 85 – 90 °C (không để cho sôi) trên bếp.

Bước 2: Tiến hành nhuộm tiêu bản

+ Nhỏ 2 – 3 giọt dung dịch lục malachite lên vết bôi và tiến hành hơ hơi nước nóng trong 5 phút. Nếu thấy thuốc nhuộm trên giấy bị khô thì phải bổ sung.



Hình 15. Các bước nhuộm nội bào tử vi khuẩn.

(Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002).

+ Rửa vết bôi bằng nước cất trong 30 giây (lúc đó các tế bào sinh dưỡng sẽ bị mất màu còn bào tử vẫn giữ lại màu).

+ Đặt tiêu bản lên giá đỡ, giá được đặt trên chậu rửa.

+ Nhỏ 1 – 2 giọt dung dịch safranin lên vết bôi, để 60 – 90 giây.

+ Rửa nước rồi thấm khô hay để vết bôi khô tự nhiên.

Bước 3: Quan sát tiêu bản với vật kính dầu ($\times 100$).

d) Kết quả: Tiêu bản nhuộm đúng thì bào tử sẽ bắt màu xanh lục, tế bào chất bắt màu đỏ hồng.

* Lưu ý: Để dễ dàng quan sát được bào tử nên cấy các vi khuẩn trên môi trường dinh dưỡng chứa 0,005% MnCl₂ (5 mg/l) trước 2 tuần trên môi trường thạch nghiêng. Có thể thay thế lục malachite 5% bằng dung dịch xanh methylene 6%.

3.6. Nhuộm chất nhân tế bào vi sinh vật

a) Nguyên tắc

– Do tính chất bắt màu của DNA trong nhân và RNA trong tế bào chất tương tự nhau.

– Dùng HCl để làm tan RNA trong tế bào chất rồi mới tiến hành nhuộm DNA trong nhân.

b) Chủng giống VSV và dụng cụ

– Chủng giống VSV: Tế bào nấm men đã nuôi cấy 48 giờ trên ống thạch nghiêng; hoặc nấm mốc *Aspergillus, Penicillium*...

– Lam kính (slide), kính hiển vi quang học nền sáng, dầu soi kính.

– Đèn côn, đĩa Petri, nước cất, que cấy đầu vòng, giấy lọc, cốc thủy tinh có mỗ 250 ml, giá đỡ, chậu rửa, bếp điện.

c) Cách tiến hành

– Làm vết bôi từ một giọt dịch huyền phù nấm men nuôi cấy sau 48 giờ. Hong khô trong không khí.

– Cố định tiêu bản bằng hơi acid acetic 5% 3 – 5 phút (đặt tiêu bản vào đĩa Petri đã có acid acetic trên gò thủy tinh sao cho vết bôi ở phía dưới lam kính).

– Nhúng tiêu bản vào cốc thủy tinh có HCl 1 N, nung nóng đến 60 °C và giữ trong 3 – 5 phút, rửa tiêu bản bằng nước.

– Nhỏ lên tiêu bản dung dịch phoocmalin 1% và giữ trong 1 – 2 phút, rửa nước.

– Nhuộm vết bôi bằng dung dịch fuchsine (0,5 – 1%), giữ trong 2 phút, rửa nước.

– Làm khô vết bôi, quan sát tiêu bản với vật kính dầu.

d) Kết quả

Tế bào chất có màu hồng, chất nhân màu đỏ thẫm.

3.7. Nhuộm theo phương pháp Ziehl-Neelsen và Kinyoun

a) Nguyên tắc

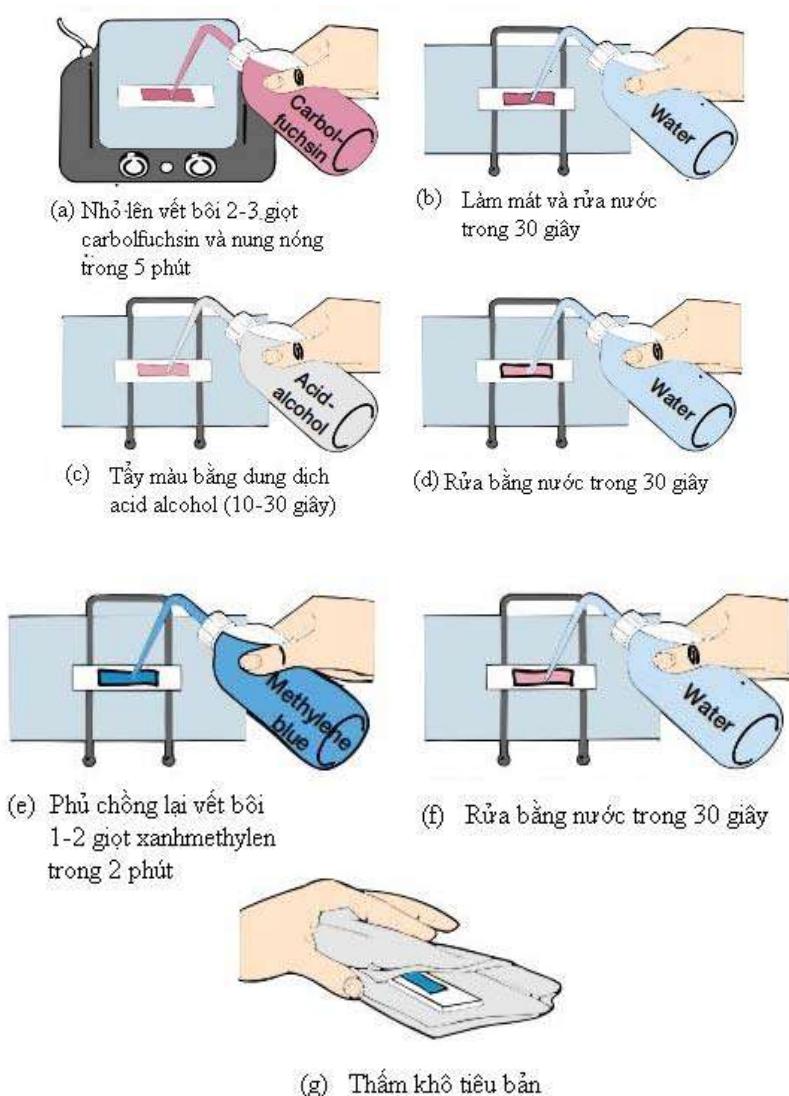
Nhuộm Ziehl-neelsen và Kinyoun là phương pháp nhuộm dựa trên đặc điểm kháng acid của các *Mycobacteria*. Chất nhuộm carbol fuchsin dưới tác dụng của nhiệt độ sẽ gắn hữu cơ với acid mycolic có trong vách tế bào vi khuẩn kháng acid còn và không bị mất sau khi tẩy màu và nhuộm với xanh methylene.

b) Chủng vi khuẩn

Vaccine BCG chúa vi khuẩn Lao – *Mycobacterium tuberculosis*.

Pha loãng 1 ống vaccine BCG với 5 ml nước cất vô trùng.

c) Cách tiến hành (hình 16)



Hình 16. Các bước nhuộm Ziehl-Neelsen và Kinyoun.

(Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002).

- Làm vết bôi và cố định tiêu bản (với dịch pha loãng vaccine BCG).
 - Đặt lên vết bôi miếng giấy lọc rồi nhô 2 – 3 giọt carbolfuchsin, lấy giấy lọc ra; đun nóng (hoặc nhô ch่อง lên 1 – 2 giọt dung dịch xà phòng Viso 1%), để 5 phút. Làm mát và rửa bằng nước trong 30 giây.
 - Tay màu bằng dung dịch acid H₂SO₄ 5% trong alcohol (cồn 95 độ), rửa tiêu bản bằng nước 10 – 30 giây.
 - Nhuộm bổ sung bằng xanh methylene Loeffler, giữ trong 3 – 5 phút, rửa tiêu bản bằng nước.
 - Làm khô vết bôi, quan sát tiêu bản với vật kính dầu ($\times 100$).
- Kết quả: Vi khuẩn kháng axít, cồn bắt màu đỏ, tế bào khác bắt màu xanh.

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. Nêu các bước tiến hành làm tiêu bản giọt ép, tiêu bản lamen nghiêng? Vì sao khi quan sát xạ khuẩn và nấm mốc chúng ta phải làm tiêu bản lamen nghiêng?
2. Nêu các bước tiến hành làm một tiêu bản cố định và nhuộm đơn? Ưu và nhược điểm của tiêu bản giọt ép so với tiêu bản cố định?
3. Nguyên tắc, các bước tiến hành nhuộm Gram? Vì sao khi nhuộm theo phương pháp nhuộm Gram thì vi khuẩn Gram dương bắt màu tím, VK Gram âm lại bắt màu đỏ?
4. Trình bày nguyên tắc và các bước tiến hành nhuộm nhân tế bào?
5. Phân biệt nội bào tử và ngoại bào tử? Vì sao nội bào tử có tính chịu nhiệt cao?
6. Trình bày nguyên tắc và các bước tiến hành nhuộm nội bào tử?

BÀI 2. PHA CHẾ MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG

I. NGUYÊN LÝ

Cũng như động – thực vật, để sinh trưởng các tế bào VSV cần các chất dinh dưỡng thích hợp. Khi nuôi cấy nhân tạo người ta làm các loại “thức ăn” cung cấp cho từng nhóm vi sinh vật khác nhau. Dạng này được gọi là “môi trường nuôi cấy”.

Môi trường thường được gọi tên theo tên người chế tạo công thức, ví dụ môi trường Hansen, Sabouraud... hoặc theo nguồn chất dinh dưỡng chính có trong môi trường, ví dụ môi trường malt, thạch – nước thịt – peptone...

Việc đánh giá chất lượng môi trường sau khi pha chế và chỉ ra được nguyên nhân làm môi trường không đạt yêu cầu là rất cần thiết.

Yêu cầu của môi trường dinh dưỡng

- Phải đảm bảo đầy đủ chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của VSV (nguồn carbon, nitơ, các chất khoáng, các chất kích thích sinh trưởng...).
- Phải có độ pH thích hợp cho mỗi loại VSV.
- Phải có độ nhót nhất định và thế oxy hóa khử thích hợp.
- Phải hoàn toàn vô trùng và không chứa các yếu tố độc hại đối với VSV.

II. THỰC HÀNH

1. Mục đích yêu cầu

- Biết cách pha chế các loại môi trường (thạch nghiêng, thạch đĩa, thạch mềm, môi trường dịch thể và môi trường xốp).
- Nhận định MT sau khi pha chế và các nguyên nhân làm MT không đạt yêu cầu.

2. Dụng cụ, hóa chất và nguyên liệu

2.1. Dụng cụ

Chuẩn bị số lượng các dụng cụ đủ dùng cho SV trong một nhóm gồm các loại sau:

- Cân tiêu ly, ống nghiệm, giá để ống nghiệm.
- Đèn cồn, đĩa Petri, bình nón loại 250 ml, cốc thủy tinh 250 ml, đùa thủy tinh, ống đồng, pipette, phễu thủy tinh lớn, nhỏ.
- Vái lọc, giấy lọc, giấy bao gói, bông mỡ, bông thấm nước, xoong nhôm, dao thớt.

2.2. Hóa chất – Nguyên liệu

Tùy theo yêu cầu và điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm ta chuẩn bị các hóa chất, nguyên liệu của một số môi trường sau:

2.2.1. Môi trường phân lập và nuôi cấy vi khuẩn

a) Môi trường nước thịt – peptone (Canh thang thường) (pH 7,4 – 7,6)

Công thức:

Nước thịt bò	1000 ml	Peptone	10 g
NaCl	5 g	pH	7 – 7,5

* Nếu làm môi trường đặc thêm 20 g thạch (agar); có thể thay nước thịt bò bằng cao thịt 5 g).

Pha ché: 500 gam thịt bò tươi cho thêm 1000 ml nước. Đun nóng đến 50 °C (duy trì 50 °C trong 2 giờ) sau đó đun sôi 30 phút. Để nguội và lắc trong rồi lọc qua bông gạc lấy dịch trong. Phân phôi môi trường vào dụng cụ, làm nút bông, bao gói rồi khử trùng ở 121 °C trong 30 phút.

b) Môi trường Sabouraud (pH 5,0): Dùng để phân lập nấm men, nấm mốc

Công thức:

Peptone.....	10 g	Glucose	30 g
Thạch (agar)	20 g	Nước cất.....	1000 ml

Pha ché: Đun nước nóng hòa peptone, glucose và thạch, xác định pH = 5, cho vào bình nón hay các ống nghiệm (làm nút bông, bao giấy báo miệng từng ống). Hấp khử trùng ở nhiệt độ 110 °C/30 phút.

Khi dùng, thạch đun chảy đến sôi, để nhiệt độ xuống còn $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, điều chỉnh pH của môi trường xuống 4,5 – 5,5 bằng dung dịch acid citric 20%.

Rót vào các đĩa Petri mỗi đĩa 15 – 20 ml môi trường, đảo đều bằng cách lắc phải, trái 3 lần. Để thạch đông tự nhiên trên mặt phẳng.

c) Môi trường thạch máu (pH 7,2 – 7,6)

Công thức:

Môi trường thạch thường (g/l): Nước thịt 100 ml, Peptone bột 10 g, NaCl tinh khiết 5 g, thạch 20 g, 15 ml máu thỏ hoặc máu cừu, nước đủ 1000 ml.

Pha ché: Đun chảy đến sôi môi trường thạch thường trong 15 phút. Để nguội đến còn $45^{\circ}\text{C} - 50^{\circ}\text{C}$, cho thêm 15 ml máu thỏ hay máu cừu lấy bằng kỹ thuật vô khuẩn đã có chất chống đông. Lắc nhẹ để trộn đều máu. Sau đó đổ ra đĩa Petri, mỗi đĩa 10 – 15 ml môi trường.

2.2.2. Môi trường phân lập và nuôi cấy nấm men

a) Môi trường Hansen (pH 6,0)

Glucose.....	50 g	Peptone	10 g
KH ₂ PO ₄	3g	MgSO ₄ .7H ₂ O	3 g
Thạch (agar)	20 g	Nước cất.....	1000 ml

b) Môi trường khoai tây – đường – cám gạo

Khoai tây	300 g	Cám gạo	100 g
Saccharose.....	50 g	Nước	1000 ml

Khoai tây gọt vỏ, rửa sạch cân 300 g thái nhỏ lát mỏng. Thêm 500 ml nước rồi đun sôi 20 phút. Lọc lấy nước trong. Cân 100 g cám gạo tốt đun sôi với 500 ml nước trong 20 phút, lọc trong. Trộn hai dịch lọc trên với nhau và thêm 50 g đường saccharose. Bổ sung nước cho đủ 1000 ml.

Nếu làm môi trường đặc thì thêm 20 gam thạch (agar). Phân phối môi trường vào dụng cụ rồi khử trùng ở 121 °C trong 30 phút.

2.2.3. Môi trường nuôi cây nấm mốc

a) Môi trường Czapek (pH 5,0 – 5,5)

Môi trường Czapek nguyên gốc, hoặc cải tiến của Thom hay Dox. Môi trường này dùng để nuôi cây xạ khuẩn, nấm mốc (bảng 1).

Bảng 1. Các loại môi trường Czapek nuôi cây nấm mốc, xạ khuẩn

<i>Czapek nguyên gốc (g/l)</i>	<i>Czapek – Thom (g/l)</i>	<i>Czapek – Dox (g/l)</i>
Saccharose 30 g	30 g	30 g
NaNO ₃ 3 g	2 g	3,5 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O 1 g	1 g	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 g	0,5 g	0,5 g
KCl 0,5 g	0,5 g	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O 0,1 g	0,01 g	0,1 g
Nước cất 1000 ml	1000 ml	1000 ml
Thạch (agar) 20 g	20 g	20 g

b) Môi trường mạch nha

Lấy 250 g lúa hay đại mạch ủ cho nảy mầm, sấy khô ở 60 – 70 °C, xay nhô, thêm 1 lít nước máy, làm nóng đến 45 – 50 °C và duy trì ở nhiệt độ này trong vòng nửa giờ, liên tục khuấy trộn để tránh vón cục. Sau đó đun nóng đến nhiệt độ 55 – 58 °C và giữ cho đến khi đường hóa hết tinh bột, tức là cho tới khi (không còn màu xanh với iod). Lọc lấy dịch đường hóa, phân vào các bình nón, khử trùng ở 0,8 atm trong 20 – 30 phút. Để nuôi cây các loại vi sinh vật khác nhau cần phải định lượng đường trong dịch mạch nha để có môi trường thích hợp.

2.2.4. Môi trường phân lập và nuôi cây xạ khuẩn

a) Môi trường Gause-1 (pH 7,2 – 7,4)

Tinh bột tan	10 g	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g	KNO ₃	1 g
Thạch (agar)	20 g	Nước cất	1000 ml
Khử trùng ở 121 °C trong 30 phút.			

b) Môi trường tinh bột – kali nitrate (pH 6,8 – 7,2)

Tinh bột tan	20 g	KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	3 g	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01g
CaCO ₃	0,5 g	MgCO ₃	0,3 g
NaCl	0,2 g	Thạch	20 g
Nước cất	1000 ml	Khử trùng ở 121 °C trong 30 phút.	

2.2.5. Môi trường xốp

Cám gạo 40 g, thóc hạt 10 g, mạt cua 150 g, nước sạch đủ ấm – trộn đều nấm thấy nước út ra kẽ tay là được.

Khử trùng ở 121 °C trong 30 phút.

3. Các bước tiến hành

3.1. Nguyên tắc pha chế môi trường dinh dưỡng

Dựa trên nhu cầu về các chất dinh dưỡng và khả năng đồng hóa các chất dinh dưỡng của từng loài vi sinh vật.

Để đảm bảo sự cân bằng về áp suất thẩm thấu giữa môi trường và tế bào vi sinh vật, ta cần điều chỉnh tỷ lệ và nồng độ các chất trong thành phần môi trường.

3.2. Các bước pha chế môi trường dinh dưỡng

Bước 1: Lựa chọn môi trường có thành phần thích hợp với mục đích sử dụng.

Bước 2: Cân, đong đầy đủ chính xác từng thành phần môi trường.

Bước 3: Hòa tan các chất vào nước, đun và khuấy cho tan, kiểm tra thể tích và pH.

Bước 4: Rót môi trường vào dụng cụ (ống nghiệm ¼ chiều cao ống, đĩa Petri ½ chiều cao, bình nón ¾ chiều cao). Làm nút bằng bông không thấm nước, bọc miệng bằng giấy loại không thấm nước.

Bước 5: Khử trùng môi trường bằng nồi hấp áp lực hơi nước – autoclave ở nhiệt độ 121 °C, áp suất 1 – 1,1 atm trong thời gian 15 – 30 phút.

Bước 6: Chế môi trường thạch nghiêng, thạch đứng, thạch đĩa và thạch mềm.

– *Làm thạch nghiêng*: Cần tiến hành ngay sau khi khử trùng môi trường vừa kết thúc và môi trường còn nóng chưa đông đặc (đặt ống nghiệm có môi trường lên giá đặt nghiêng

nhưng không được để môi trường chạm vào nút bông; để yên cho mặt thạch đông đặc, yêu cầu mặt thạch phải phẳng, nhẵn liên tục).

– *Làm môi trường thạch đứng*: Đặt ống nghiệm có môi trường lên giá để yên cho đến khi môi trường nguội và đông đặc.

– *Làm môi trường thạch đĩa*: Rót môi trường vào đĩa Petri (khoảng 10 – 15 ml – 1/2 chiều cao đĩa) sau khi tay trái mở hé nắp trên của đĩa. Đậy nắp trên lại, xoay tròn đĩa Petri để môi trường được phân phói đều trên mặt thạch. Để yên cho môi trường nguội và đông đặc, sau đó lật ngược cho đáy dưới của đĩa Petri lên trên để bề mặt thạch được khô.

– *Làm môi trường thạch mềm* (để kiểm tra khả năng di động và giữ giống vi khuẩn).

Công thức: Peptone – 10 g; NaCl – 5 g; Cao thịt – 3 g; Cao nấm men – 6 g; Thạch (agar) – 3,5 g, Nước cất 1000 ml.

Cách pha chế: Đun sôi hòa tan hoàn toàn các thành phần điều chỉnh pH 7,6, đóng ống nghiệm 12 mm, mỗi ống 3 – 4 ml. Hấp 121 °C trong 15 phút.

Bước 7: Bảo quản và kiểm tra môi trường: Môi trường chưa sử dụng ngay cần được bảo quản ở chỗ mát, hạn chế tác dụng của ánh sáng. Tốt nhất để vào ngăn mát tủ lạnh có nhiệt độ 4 – 6 °C.

Trước khi sử dụng, loại bỏ các ống môi trường có vi sinh vật phát triển. Để kiểm tra độ vô khuẩn của môi trường, người ta thường đặt chúng vào tủ âm 37 °C trong 48 – 72 giờ. Sau lấy ra chọn những ống môi trường đạt yêu cầu.

3.3. Đánh giá môi trường

Kiểm tra kết quả môi trường bằng cách để các ống nghiệm hay đĩa Petri đựng môi trường vào tủ âm 37 °C trong 48 – 72 giờ để xem có VSV phát triển trong đó hay không. Phân biệt những ống môi trường đạt yêu cầu và các ống bị tạp nhiễm (nếu có).

Tùy môi trường để có cách đánh giá. Ví dụ:

– Môi trường canh thang (nước thịt – peptone – NaCl tinh khiết): yêu cầu môi trường phải trong, màu vàng nhạt hoặc hơi sẫm.

– Môi trường thạch thường: thạch phải tan đều, môi trường không được quá cứng hoặc quá mềm.

– Môi trường thạch máu: màu thạch đỏ tươi, Nếu thạch ngả màu đen là máu đã bị chín. Nếu những cục thạch trắng nhỏ là thạch chưa tan hết đã cho máu vào.

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. Yêu cầu và nguyên tắc cơ bản của việc pha chế một loại môi trường dinh dưỡng?
2. Nêu các bước pha chế một loại môi trường dinh dưỡng? Nguyên nhân môi trường bị hư hỏng? Phương pháp bảo quản môi trường? Cách nhận biết môi trường đạt yêu cầu?
3. Theo tính chất vật lý, người ta chia môi trường dinh dưỡng ra làm mấy loại? Môi trường thạch mềm dùng để làm gì?
4. Môi trường xác định có thành phần khác với môi trường phân lập VSV như thế nào? Cho ví dụ minh họa.
5. Tầm quan trọng của việc làm vô trùng các dụng cụ và môi trường nuôi cây VSV?

Bài 3. PHÂN LẬP, NUÔI CÁY VÀ GIỮ GIỐNG VI SINH VẬT

I. NGUYÊN LÝ

Phân lập VSV là một quá trình tách riêng một loại VSV từ quần thể gồm nhiều loài VSV, sau đó gieo chúng lên bề mặt môi trường thạch dinh dưỡng chọn lọc. Sau khi ủ ở nhiệt độ thích hợp, các VSV sẽ phân chia nhiều lần tạo thành những quần thể mọc riêng biệt gọi là khuẩn lạc. Một ít tế bào trong khuẩn lạc được cấy truyền vào ống môi trường giữ giống và ủ ở các điều kiện thích hợp để chúng phát triển thành quần thể mới. Quần thể vi khuẩn trong ống nghiệm này được gọi là một chủng VSV hoặc là ống giống phân lập.

Nuôi cây VSV trên môi trường nhân tạo thích hợp nhằm tăng số lượng VSV trong mẫu thu nhận từ môi trường và tách được những khuẩn lạc riêng rẽ để nhận dạng khuẩn lạc. Để nuôi cây các mẫu có VSV người ta dùng môi trường phân lập đặc. Môi trường này ngoài các chất dinh dưỡng còn có một số chất khác có tác dụng ức chế hoặc kích thích chọn lọc các VSV.

Cây truyền là kỹ thuật dùng que cấy châm vào khuẩn lạc rồi cây sang ống MT thạch nghiêng trong điều kiện vô trùng nhằm tách biệt VSV nghỉ ngơi, dù mẫu có ít hay nhiều VSV. Khi cây truyền cần lưu ý:

- Dùng que cấy đầu nhọn chạm vào khuẩn lạc VSV, vì như vậy sẽ làm giảm tỷ lệ nhiễm các VSV khác.
- Cây truyền theo phương pháp cây cạn dần, chỉ nên để vài đường cây đầu tiên của vùng sau chạm vào vùng trước, như vậy sẽ có được những khuẩn lạc mọc riêng biệt.
- Để lưu giữ các chủng VSV mới phân lập được, ngoài phương pháp đặt lạnh, người ta thường giữ chúng trên đất cát, trên hạt, hay phương pháp đông khô...

II. THỰC HÀNH

1. Mục tiêu

- Biết cách phân lập, nuôi cây và bảo quản một chủng giống vi sinh vật thuần khiết.
- Nhận biết được tính chất phát triển của vi sinh vật trên môi trường lỏng và các loại khuẩn lạc trên môi trường đặc.

2. Mẫu vật, dụng cụ và hóa chất

2.1. Chuẩn bị dụng cụ vật liệu cần thiết

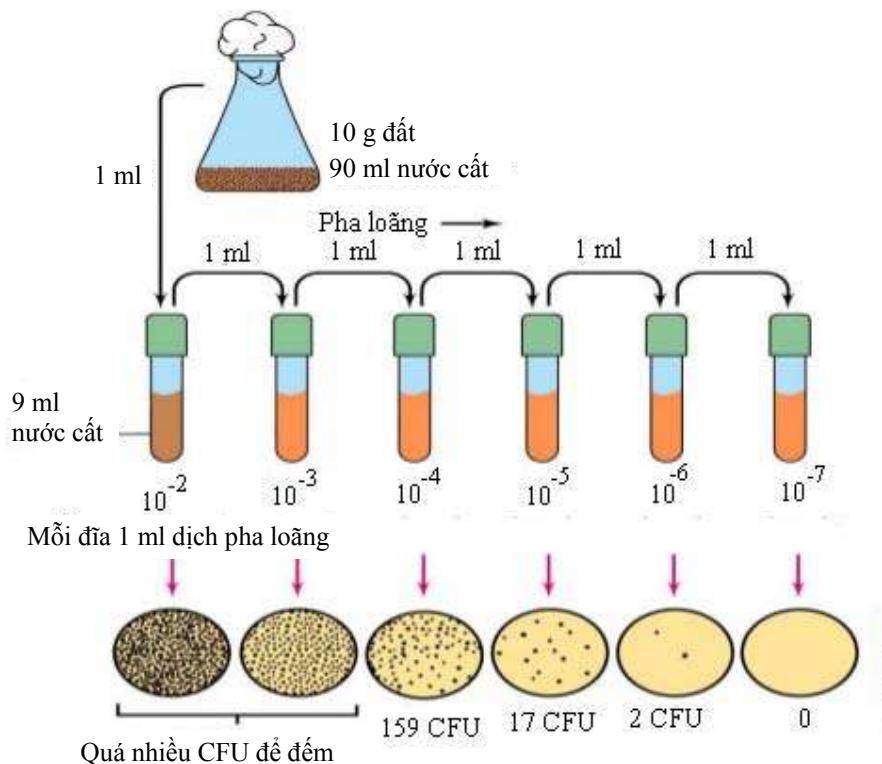
- Các bình nón đựng môi trường và các ống môi trường thạch nghiêng vô trùng cho vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc, nấm men.

– Một bình nón chứa 99 ml nước cát vô trùng và 10 ống nghiệm có chứa 9 ml nước cát vô trùng.

– Que trang, que cây, pipette, đũa thủy tinh, hộp Petri... đã vô trùng.

2.2. Thu nhận mẫu và pha loãng

– Dùng dao rửa sạch, lau cồn để lấy mẫu. Lấy khoảng 200 g đất ở 3 – 4 địa điểm khác nhau trên diện tích 200 m² bằng cách gạt rác bì mặt (nếu có) lấy các lớp đất khác nhau (0 cm, 5 cm, 10 cm... theo phẫu diện thẳng đứng. Các mẫu đất được đựng trong túi nilon đã khử trùng).



Hình 17. Sơ đồ minh họa quá trình phân lập vi sinh vật hiếu khí từ đất.

– Mẫu đem về được trộn đều, cân lấy 10 g cho vào bình nón đựng 90 ml nước cát vô trùng. Dùng đũa thủy tinh khuấy thật “tan”, để lắng 30 phút. Như vậy ta được dịch huyền phù có độ pha loãng là 1:10.

– Lấy 1 ml dịch huyền phù này (có độ pha loãng là 1:10) hòa vào ống nghiệm có chứa 9 ml nước cát vô trùng ta được dịch huyền phù có độ pha loãng là 1:100. Cứ tiếp tục như vậy ta sẽ có các độ pha loãng tiếp theo 1:1000; 1:10000. Tùy theo số lượng VSV trong đất nhiều hay ít mà pha loãng đến nồng độ thích hợp để tạo các khuẩn lạc riêng rẽ. Khuẩn lạc là đám tế bào xuất phát từ một tế bào duy nhất. Đếm số lượng khuẩn lạc là biết số lượng tế bào trong một dịch đã cho được biểu thị bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc CFU (colony-forming unit).

3. Các bước tiến hành

3.1. Phân lập vi sinh vật

3.1.1. Phân lập vi sinh vật từ đất

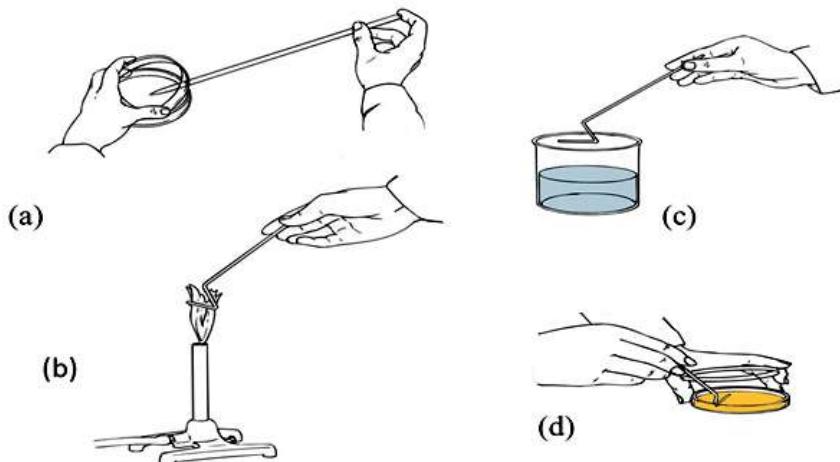
a) Phân lập vi khuẩn bằng phương pháp trại dịch

– Nhỏ 0,1 ml dịch huyền phù đất ở độ pha loãng (10^{-5} hay 10^{-6}) lên mặt MT đặc trong đĩa Petri. Nhúng que gạt vào cốc đựng cồn, đốt cháy trên ngọn lửa trong 30 giây đợi nguội, gạt đều giọt dịch này trên bề mặt môi trường thạch đĩa (hình 18).

– Nuôi vi sinh vật: Lật úp đĩa thạch, đặt vào tủ âm ở nhiệt độ thích hợp (vi khuẩn $30 - 37^{\circ}\text{C}$; nấm men, nấm sợi, xạ khuẩn $26 - 28^{\circ}\text{C}$). Sau 1 – 2 ngày đối với vi khuẩn và sau 3 – 5 ngày đối với nấm men và nấm sợi, xạ khuẩn 7 – 14 ngày). Tiến hành quan sát khuẩn lạc trên mặt đĩa thạch bằng mắt thường hay kính lúp.

– Thu nhận chủng vi sinh vật thuần khiết:

Dùng que cây đã khử trùng lấy một ít sinh khối của từng khuẩn lạc riêng biệt, cấy vào từng ống nghiệm chứa môi trường thạch nghiêng, đặt vào tủ âm có nhiệt độ thích hợp. Sau một thời gian nuôi cấy, kiểm tra lại độ thuần chủng của giống VSV đã mọc trong từng ống nghiệm thạch nghiêng.



Hình 18. Phân lập vi khuẩn bằng phương pháp trại dịch.

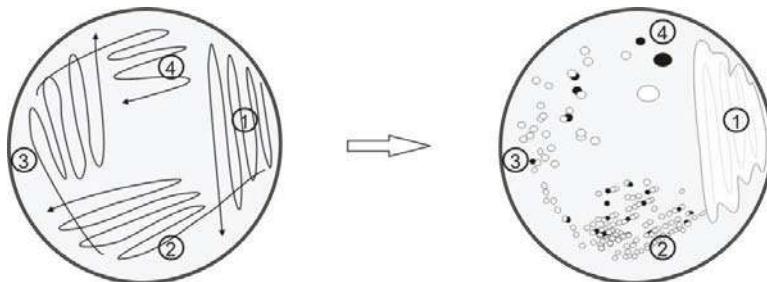
(Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002).

b) Phân lập vi sinh vật bằng que cây đầu vòng

– Nung đỏ đầu que cây đầu vòng, làm nguội trong không khí khoảng 15 giây. Cho vòng que cây chấm vào dịch huyền phù đã pha loãng có chứa VSV cần phân lập.

– Tay trái hé mở nắp đĩa thạch. Đặt đầu que cây vào 1 góc đĩa thạch, chấm nhẹ để loại bớt tế bào một lần nữa. Từ điểm này đẩy nhẹ đầu que cây lướt nhanh trên bề mặt thạch theo đường ziczac. Sau khi cây xong đường ziczac thứ nhất thì khử trùng que cây để cây đường ziczac thứ 2 rồi thứ 3. Các đường cây sau sẽ tạo ra các khuẩn lạc mọc cách xa nhau. Đậy nắp hộp. Khử trùng que cây trước khi cắm vào giá.

– Các thao tác phải nhanh tay và làm trên ngọn lửa đèn còn đặt trong tủ cây, đảm bảo vô trùng.



Hình 19. Phân lập vi khuẩn bằng que cấy đầu vòng.

c) Phương pháp trộn dịch đất pha loãng trong môi trường thạch nóng chảy

Dùng pipette vô trùng nhỏ 1ml dịch huyền phù đã pha loãng ở nồng độ nhất định (10^{-5} hay 10^{-6}) vào 100 ml môi trường thạch đã nóng chảy và để nguội đến $45 - 50^{\circ}\text{C}$ trong bình nón, lắc đều rồi đổ ra các đĩa Petri mỗi hộp cỡ 15 ml. Gói các đĩa Petri lại, lật úp và đặt vào tủ âm ở nhiệt độ $28 - 30^{\circ}\text{C}$ trong 48 – 72 giờ.

3.1.2. Phân lập VSV từ không khí

VSV trong không khí chủ yếu là do các hạt bụi, hạt nước nhỏ mang theo bào tử hay tế bào của chúng. Thông thường là bào tử của các vi nấm như: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, bào tử xạ khuẩn, nấm men và vi khuẩn hiếu khí. Để phân lập VSV từ không khí, người ta thường tiến hành theo các bước sau:

- Chuẩn bị môi trường Sabouraud thạch đĩa.

- Đổ đĩa Petri có môi trường Sabouraud, mở nắp tại một chỗ kín gió trong 5 – 10 phút, sau đó đậy nắp lại.

- Đặt đĩa Petri trên vào tủ âm ở nhiệt độ thích hợp sau 2 – 3 ngày, trên bề mặt thạch xuất hiện các khuẩn lạc khác nhau. Từ đó người ta chọn ra các khuẩn lạc riêng biệt, cấy vào các ống nghiệm thạch nghiêng.

3.1.3. Phân lập VSV từ nước thải

Muốn phân lập VSV từ nước thải ta thường tiến hành theo các bước sau:

- Thu mẫu nước chứa VSV theo đúng quy định TCVN.

- Bồi dưỡng mẫu (nếu số lượng VSV ít) hay pha loãng (nếu mẫu quá nhiều VSV).

- Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng thạch đĩa (tùy đối tượng phân lập mà chọn dùng môi trường thích hợp. Ví dụ, phân lập vi khuẩn dùng môi trường nước thịt – thạch peptone; phân lập nấm men dùng môi trường Hansen; Phân lập nấm mốc dùng môi trường Czapek hay Czapek – Dox...).

- Ta nhỏ 0,1 ml nước lên môi trường đặc. Dùng que gạt gạt đều khắp mặt thạch, sau đó gói đĩa Petri lại, ghi ngày, nơi lấy mẫu loại nước gì, rồi đem đặt vào tủ âm có nhiệt độ

thích hợp. Sau vài ngày trên bề mặt thạch xuất hiện các khuẩn lạc khác nhau. Từ đó người ta chọn ra các khuẩn lạc riêng biệt, cấy vào các ống nghiệm thạch nghiêng.

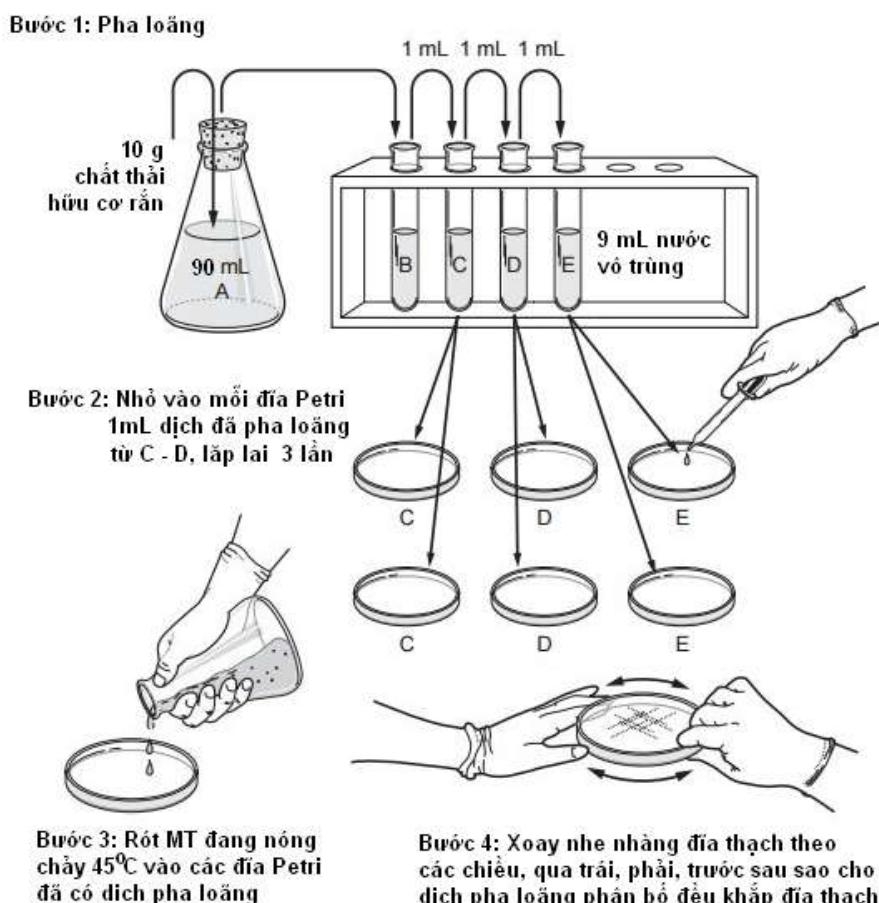
3.1.4. Phân lập vi sinh vật từ chất thải hữu cơ rắn

Muốn phân lập VSV từ các chất thải hữu cơ rắn như đất, các khói thực phẩm bị nhiễm khuẩn, từ các loại quả chín bị hỏng, từ các bệnh phẩm...

Chuẩn bị:

– Thu mẫu có chứa vi sinh vật: Đất có rác thải hữu cơ đang phân hủy 100 g, các khói thực phẩm bị nhiễm khuẩn, từ các loại quả chín bị hỏng... mỗi loại từ 50 – 100 g.

– Pha chế môi trường thạch đĩa (tùy đối tượng phân lập mà chọn môi trường có thành phần phù hợp).



Hình 20. Các bước phân lập vi sinh vật từ chất thải hữu cơ rắn.

Tiến hành thí nghiệm:

Bước 1: Nghiền nhỏ mẫu bằng cối chày sứ, rồi pha loãng mẫu vào nước cất đã khử trùng, đánh tan hoặc để lắng, tiếp tục pha loãng đến nồng độ thích hợp từ 10^{-1} đến 10^{-10} .

Bước 2: Nhỏ 0,1 ml dịch huyền phù đã pha loãng vào đĩa thạch.

Bước 3: Rót môi trường đang nóng chảy 45°C vào các đĩa Petri trên.

Bước 4: Dùng tay xoay đĩa thạch theo chiều kim đồng hồ, trái, phải, trước, sau sao cho các VSV có trong dịch pha loãng phân bố đều khắp trong môi trường thạch.

Gói các đĩa thạch lại, đè ngày, nới lấy mẫu, ký hiệu mẫu, lật úp ngược lại rồi đặt vào tủ âm có nhiệt độ thích hợp. Sau $48 - 72$ giờ, trên bề mặt thạch xuất hiện các khuẩn lạc khác nhau. Từ đó người ta chọn ra các khuẩn lạc riêng biệt, cấy vào các ống nghiệm thạch nghiêng

3.1.5. Kiểm tra kết quả phân lập

Khi phát triển trên môi trường đặc trong đĩa Petri, sau $3 - 5$ ngày VSV tạo thành các khuẩn lạc riêng lẻ, có hình thái khác nhau phụ thuộc vào loài VSV.

3.2. Nuôi cấy vi sinh vật

3.2.1. Nuôi dưỡng vi khuẩn

– *Nguyên tắc*: Nuôi dưỡng là quá trình đảm bảo và duy trì những điều kiện thuận lợi nhất cho sự hoạt động và sinh sản của vi khuẩn.

– *Tiến hành*: Đối với môi trường đặc ta lật úp ngược các đĩa Petri rồi đặt vào tủ âm ở nhiệt độ $28 - 30^{\circ}\text{C}$ trong $48 - 72$ giờ. Sau thời gian trên ở bề mặt thạch đĩa sẽ mọc các khuẩn lạc riêng biệt mắt thường quan sát được.

3.2.2. Cấy vi sinh vật

Có thể cấy VSV trên các môi trường tự nhiên (mạch nha, khoai tây, cà rốt...), ống môi trường đặc thạch nghiêng, trong môi trường lỏng hoặc trên môi trường thạch đĩa (rắn) bằng các dụng cụ như: cấy bằng pipette Pasteur hay cấy bằng que cấy.



Hình 21. Hình thái khuẩn lạc của một số vi sinh vật trên môi trường thạch.

1. Vi khuẩn – *Lactobacillus bulgaricus*; 2. Xạ khuẩn – *Streptomyces albidoflavus*;
3. Vi nấm – *Penicillium chrysogenum*).

Sau khi đã phân lập được khuẩn lạc VSV thuần chủng trên đĩa Petri, dùng que cấy cấy truyền VSV sang các môi trường trên. Có thể cấy ziczac, chấm điểm, trải dài, cấy đậm sâu trong môi trường thạch, hoặc trộn trong thạch nóng chảy. Khi cấy truyền phải tiến hành trên gần ngọn đèn cồn.

3.2.3. Nuôi vi sinh vật

Sau khi cấy VSV nghiên cứu lên MT (đặc hay lỏng) xong đặt môi trường vào tủ âm ở nhiệt độ, thời gian thích hợp tùy từng loại VSV.

3.2.4. Dánh giá kết quả

– *Trên môi trường đặc*: Nhận xét hình thái khuẩn lạc như màu sắc, kích thước, dạng S (Smooth) – trơn bóng, dạng R (Rough) – xù xì, dạng M (Mucoid) – nhầy nhót.

– *Trên môi trường lỏng*: Vi sinh vật làm đục đều môi trường. Vi sinh vật phát triển lắng xuống đáy môi trường hay vi sinh vật mọc thành váng trên mặt môi trường.

3.3. Giữ giống vi sinh vật

– *Mục đích*: Đảm bảo được tính chất của giống (duy trì gần như nguyên vẹn đặc tính ban đầu của giống ở vi sinh vật trước lúc cất giữ) đủ tiêu chuẩn cho quá trình sản xuất.

– *Nguyên tắc*: Làm chậm quá trình hô hấp và trao đổi chất của vi sinh vật. Đồng thời ngăn cản sự sinh sản của chúng.

– Phương pháp

+ Bước 1: Tiền bảo quản, chọn chủng vi sinh vật ở điều kiện và giai đoạn tối ưu cho bảo quản.

+ Bước 2: Chọn phương pháp thích hợp đối với từng loài vi sinh vật cần bảo quản.

– Các phương pháp bảo quản hiện nay

+ Cây truyền định kỳ trên môi trường thạch nghiêng. Các vi khuẩn, nấm men có thể giữ ở 4 – 5 °C trong tủ lạnh hoặc phòng lạnh khoảng 2 – 3 tháng, nấm sợi 3 – 4 tháng ở 3 – 5 °C (nếu vi sinh vật sinh acid cần bổ sung dung dịch đệm vào môi trường).

+ Trộn vi sinh vật với glycerol với tỷ lệ 1 : 20 và giữ ở -20 °C đến -80 °C. Phương pháp này giữ được 5 – 6 tháng, nếu muốn giữ lâu hơn nữa (1 – 2 năm) để các ống giống trong glycerol vào trong nitơ lỏng ở -100 đến -196 °C.

+ Người ta thường dùng phương pháp đông khô để giữ giống vi sinh vật trong vài ba năm, hoặc giữ trong nitơ lỏng (-196 °C) bảo quản lâu dài nhiều chục năm.

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. Nguyên tắc và phương pháp chung để phân lập VSV ở dạng thuần khiết từ đất, nước, không khí, chất thải hữu cơ?
2. Cách phân lập nấm men *Saccharomyces cerevisiae* từ đất?
3. Những điểm khác biệt giữa phương pháp nuôi cấy vi sinh vật trên môi trường đặc và môi trường lỏng?
4. Các kiểu gieo cấy vi sinh vật trên môi trường thạch đĩa, môi trường lỏng?

5. Thế nào là phương pháp cấy cạn dần? Ý nghĩa của phương pháp cấy cạn dần?
6. Ưu và nhược điểm của phương pháp cấy vi khuẩn bằng que cấy và cấy bằng pipette Pasteur?
7. Các phương pháp giữ giống vi sinh vật hiện nay? Cơ sở khoa học của các phương pháp giữ giống?

Bài 4. ĐO KÍCH THƯỚC TẾ BÀO VÀ ĐÉM SỐ LUỢNG VI SINH VẬT

I. NGUYÊN LÝ

Muốn đo kích thước của tế bào VSV người ta sử dụng thước đo đặc biệt. Hiện nay có nhiều loại thước đo nhưng thông dụng hơn cả là thước đo thị kính và thước đo vật kính của hãng OLYMPUS Nhật Bản.

Trong công tác điều tra VSV trong các môi trường đất, nước, không khí, chất thải hữu cơ hay giám định giống... thì việc xác định số lượng VSV là rất cần thiết như đếm để biết số lượng VSV trong 1 ml canh khuẩn; để so sánh hai môi trường trong việc nuôi dưỡng VSV; để tiêm một số lượng nhất định vi khuẩn vào một động vật thí nghiệm; để tìm liều gây chết tối thiểu (liều LD₅₀) của VSV đối với một động vật thí nghiệm...

Có hai nhóm phương pháp đếm số lượng VSV đó là nhóm đếm trực tiếp bằng buồng đếm hồng cầu và phương pháp đếm gián tiếp như đếm CFU (colony-forming unit) trên thạch đĩa, phương pháp pha loãng tới hạn (MPN), phương pháp đo OD...

II. THỰC HÀNH

1. Mục tiêu

Biết cách đo kích thước và xác định số lượng của một số VSV trong không khí, trong mẫu đất, vật phẩm, chất thải hữu cơ và nước thải.

2. Mẫu vật, dụng cụ, thiết bị hóa chất

2.1. Mẫu vật

- Chuẩn bị dung dịch nuôi cấy tế bào nấm men, nấm mốc, vi khuẩn *E.coli*, *B. subtilis*, xạ khuẩn 24 – 48 giờ.
- Chuẩn bị trước các tiêu bản “giọt ép” từ canh trường nuôi vi khuẩn hoặc nấm men trước 24 giờ.
- Chuẩn bị môi trường thạch đĩa (MT thạch thường, MT thạch máu, MT Sabauroud).

2.2. Dụng cụ thiết bị

Thước đo vật kính và thị kính OLYMPUS; kính hiển vi quang học.

2.3. Các loại hóa chất (theo thành phần từng môi trường)

(1) Môi trường thạch thường (pH 7,4 – 7,6)

Kiểm tra tổng số vi khuẩn hiếu khí.

- Công thức 1 (TCVN):

Cao thịt 1,0 g

Peptone 1,0 g

NaCl 5 g

Thạch (agar) 15 g

Nước cất 1000 ml

– *Công thức 2: (TCVN)*

Cao thịt.....	3,0 g	Peptone	5,0 g
Thạch (agar)	15 g	Nước cất.....	1000 ml

– *Cách pha chế:*

+ Cho các thành phần vào nước đã đun nóng để hòa tan.

+ Điều chỉnh pH về khoảng 8,2 bằng NaOH 1N, đun sôi trong 10 phút.

+ Lọc trong và điều chỉnh pH từ 7,2 – 7,4.

+ Cho vào các bình cầu và hấp ở $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ trong 15 phút.

(2) *Môi trường thạch máu* (xem bài pha chế môi trường dinh dưỡng)

(3) *Môi trường thạch Sabouraud* (xem bài pha chế môi trường dinh dưỡng)

3. Các bước tiến hành

3.1. Đo kích thước tế bào VSV

Dùng thước đo thị kính để đo kích thước tế bào VSV (biểu thị bằng đơn vị micromet μm ; $1 \mu\text{m} = 1 \times 10^{-6} \text{ m} = 1 \times 10^{-3} \text{ mm} = 10.000 \text{ \AA}$ (angstrom)).

Thước đo thị kính là một miếng thủy tinh tròn, ở chính giữa có một thước nhỏ 5 mm được chia thành 100 phần bằng nhau và được đánh số từ 0 đến 100.

Thước đo vật kính là một tâm thủy tinh, ở giữa có một thước nhỏ 1 mm được chia thành 100 khoảng đều nhau, vì vậy mỗi khoảng chia là 0,01 mm hay 10 μm .

3.1.1. Xác định giá trị mỗi khoảng của thước đo thị kính

Để xác định giá trị mỗi khoảng của thước đo thị kính đối với một độ phóng đại, ta làm như sau:

Bước 1: Tháo thấu kính trên của thị kính ra, lắp thước đo thị kính vào màn chắn của thị kính sao cho vạch chia nằm ở phía dưới. Giá trị của mỗi khoảng chia của thước đo thị kính đối với từng độ phóng đại của thị kính cần phải được xác định trước nhờ dùng thước đo vật kính. Đặt thước đo vật kính OLYMPUS lên bàn kính, nơi vẫn thường để tiêu bản.

Bước 2: Dùng vật kính có bội giác nhỏ lấy tiêu cự và dịch thước đo vào giữa thị trường. Thay vật kính có bội giác lớn mà ta định dùng để đo kích thước tế bào VSV.

Bước 3: Điều chỉnh bàn kính sao cho một vạch của hai thước này trùng khít lên nhau và tìm chỗ trùng khít của vạch thứ hai, rồi xác định khoảng cách giữa hai vạch của thước đo thị kính bằng μm .

* *Tính kết quả:* Ví dụ khi ta sử dụng kính hiển vi có thị kính ($\times 10$), vật kính ($\times 40$).

– Quan sát vào kính hiển vi ta thấy có 5 khoảng chia của thước đo vật kính (tức 50 μm) nằm gọn vào 20 khoảng chia của thước đo thị kính, vậy mỗi khoảng chia của thước đo thị kính với độ phóng đại đang dùng ($\times 40$) là 2,5 μm .

3.1.2. Tiến hành đo kích thước

Mỗi sinh viên tiến hành đo kích thước tế bào nấm men theo trình tự sau:

Để đo kích thước (tế bào nấm men, vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc...) ta phải làm tiêu bản “giọt ép”, ít khi làm tiêu bản nhuộm màu.

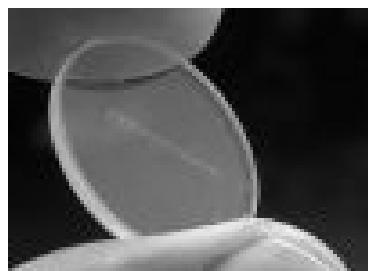
– Đặt tiêu bản có VSV cần đo lên bàn kính. Điều chỉnh bàn kính sao cho thấy rõ tế bào VSV và thước đo thị kính.

– Điều chỉnh bàn kính sao cho tế bào VSV nằm gọn và dọc theo thước đo thị kính.

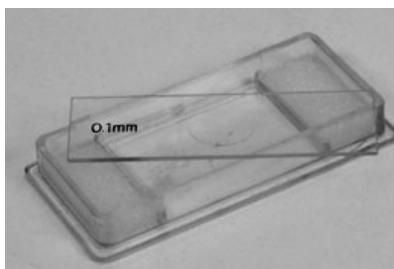
– Đếm số khoảng mà tế bào VSV choán chỗ.

Xoay ống thị kính để đo bề khác.

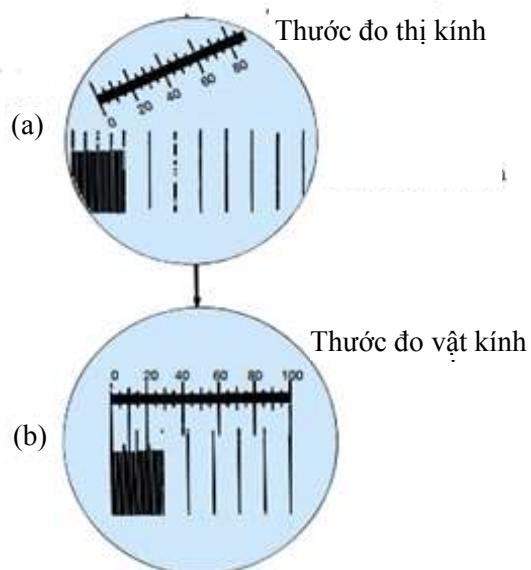
Ví dụ: đường kính tế bào nấm men nằm đúng vào hai khoảng của thước đo thị kính, tức là ($2,5 \times 2 = 5,0 \mu\text{m}$).



Thước đo thị kính



Thước đo vật kính



Hình 22. Xác định giá trị mỗi khoảng của thước đo thị kính.

a. Thước đo thị kính và vật kính nhìn qua kính hiển vi quang học;

b. Xác định khoảng cách giữa hai vạch của thước đo thị kính bằng μm .

* Những điểm cần lưu ý

– Kích thước tế bào có thể thay đổi tùy theo thành phần môi trường dinh dưỡng của canh trường nuôi cấy vi sinh vật.

– Muốn đo kích thước của vi khuẩn hình cầu ta đo đường kính, của trực khuẩn – đo bề ngang và chiều dài, xạ khuẩn và nấm mốc – đo bề ngang của sợi.

– Nếu tế bào vi khuẩn chuyển động thì ta hơ nóng một chút hay thêm vào huyền phù một giọt dung dịch 0,1% thạch (agar) nóng chảy. Nếu làm tiêu bản cố định nhuộm màu sẽ làm cho kích thước tế bào bị thay đổi ít nhiều.

3.2. Đếm số lượng vi sinh vật trong không khí

Trong không khí, ngoài bụi ra còn có các VSV như vi khuẩn, vi khuẩn cổ, nấm mốc... Các thành phần này có liên quan mật thiết với nhau, bụi càng nhiều thì số lượng VSV càng cao.

Trong không khí ngoài những tạp khuẩn, còn có thể gặp các loại cầu khuẩn gây bệnh, trực khuẩn lao, trực khuẩn bạch hầu... Đặc biệt các loại liên cầu khuẩn, tụ cầu khuẩn làm tan huyết truyền bệnh qua đường không khí. Những nơi như bệnh viện, an dưỡng đường, trong không khí dễ có các vi khuẩn gây bệnh. Không khí ở các kho tàng dễ có nhiều nấm mốc.

Mỗi loài vi sinh vật trong không khí là một chỉ điểm cho nguồn gốc nhiễm khuẩn. Nếu trong không khí có một số vi khuẩn thường gặp trong đất như *Clostridium*, chứng tỏ không khí bị nhiễm khuẩn do bụi đất.

Không khí làm lan truyền mầm bệnh khi có đủ hai yếu tố cơ bản:

- Các vi khuẩn tồn tại trong không khí với nồng độ đủ cao.
- Người dễ cảm thụ hít không khí nhiễm khuẩn đó.

*** Tiêu chuẩn vi sinh vật trong không khí**

Đến nay chúng ta chưa có tiêu chuẩn quy định chất lượng không khí dựa theo lượng VSV trong 1 m³ không khí. Sau đây là một số tiêu chuẩn dùng để tham khảo:

- Theo Preobrane (Pháp), không khí sạch khi có số lượng vi khuẩn ≤ 1000 CFU/m³.
- Theo Ginokova (Nga), không khí sạch khi chỉ có 5 – 10 khuẩn lạc mọc trên mặt thạch để trong 10 phút; vừa khi có 20 – 25 khuẩn lạc; xấu khi có > 25 khuẩn lạc.
- Theo Romanovic, trong cơ sở sản xuất thực phẩm, không khí rất tốt khi chỉ có < 20 khuẩn lạc mọc trên mặt thạch để trong 10 phút và không có khuẩn lạc nấm mốc; tốt khi có 20 – 50 khuẩn lạc và 2 khuẩn lạc nấm mốc; vừa khi có 50 – 70 khuẩn lạc và 5 khuẩn lạc nấm mốc; xấu khi có > 70 khuẩn lạc vi khuẩn và > 5 khuẩn lạc nấm mốc.

Căn cứ vào kết quả số vi sinh có trong 1 m³ không khí của phòng, có thể đánh giá chất lượng không khí dựa theo tiêu chuẩn của V. Omelanskii (Nga) sau đây:

<i>Số lượng vi sinh/m³ không khí</i>	<i>Chất lượng không khí</i>
< 312 (< 5 khuẩn lạc/3 đĩa thạch)	Tốt
312 – 1250 (5 – 20 khuẩn lạc/3 đĩa thạch)	Khá
1250 – 1562 (20 – 25 khuẩn lạc/3 đĩa thạch)	Vừa
> 1562 (> 25 khuẩn lạc/3 đĩa thạch)	Kém

Có nhiều phương pháp để xác định số lượng VSV trong không khí nhưng phương pháp đơn giản và thông dụng nhất hiện nay vẫn là phương pháp để lắng bụi của Koch.

3.2.1. Cách để lắng bụi theo phương pháp Koch

a) Chuẩn bị các môi trường thạch đĩa

Để kiểm tra số lượng VSV trong không khí tại một địa điểm nào đó, người ta thường sử dụng các loại môi trường thạch đĩa như MT thạch thường, MT thạch máu, MT Sabouraud. Trước khi đặt thạch ra ngoài không khí phải để thạch vào tủ âm để cho thạch ấm lại và mặt thạch khô.

b) Tiến hành

– Đến nơi định kiểm tra không khí, mở các đĩa thạch ra (nắp hộp dựng nghiêng bên cạnh đĩa thạch).

– Mở nắp đĩa thạch trong thời gian 5, 10, 15 phút tùy theo dự kiến về mức độ ô nhiễm không khí nơi kiểm tra. Ví dụ: ở phòng mổ, bệnh viện cần để đĩa thạch 15 phút. Nếu kiểm tra không khí ngoài chợ, ngoài đường phố đông người thì chỉ cần để trong 5 phút và nếu kiểm tra ở một nhà ăn nào đó có thể để độ 10 phút.

Sau đó, đậy nắp đĩa thạch và lật úp ngược lại.

+ Để tủ âm 37 °C với thạch đĩa – môi trường thạch máu.

+ Để 28 °C – 30 °C với đĩa thạch – môi trường Sabouraud.

+ Theo dõi 24 giờ đôi vời vi khuẩn và 5 ngày với nấm sợi (nấm mốc).

Vị trí đặt mẫu:

Muốn kiểm tra không khí tại bất kỳ cơ sở nào nên để ở nhiều nơi khác nhau:

Kiểm tra không khí trong phòng: 5 vị trí (ở giữa và 4 góc phòng) mỗi nơi 3 đĩa thạch.

Kiểm tra không khí ở đường phố, ngoài sân: nên tránh chỗ ánh nắng, để nhiều đĩa thạch trong các tình huống khác nhau: lúc đông người, lúc ít người qua lại.

Cần chú ý:

– Đôi với kho tàng ít ánh sáng, độ ẩm cao nên chú ý kiểm tra nấm mốc.

– Đôi với bệnh viện, nhà Ở, phòng thí nghiệm nên chú ý kiểm tra liên cầu khuẩn và tụ cầu khuẩn.

3.2.2. Đọc kết quả

Cách thứ nhất:

Tổng số vi khuẩn trong 1 m³ không khí được tính theo công thức:

$$X = \frac{A \times 100 \times 100}{S \times K}$$

X: tổng số VSV trong 1 m³ không khí;

A: tổng số VSV trong một đĩa thạch;

S: diện tích của đĩa Petri (cm²);

K: hệ số thời gian để đĩa Petri;

với K = 1 (5 phút); K = 2 (10 phút); K = 3 (15 phút).

Cách thứ hai: Phương pháp xác định số lượng VSV trong 1 m³ không khí theo V. Omelanskii:

- Mở nắp đĩa Petri trong thời gian 5 phút.
- Nuôi ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.

* Tính kết quả: Số lượng VSV trong 1 m³ không khí theo V. Omelanskii

<i>Đường kính đĩa Petri (cm)</i>	<i>Diện tích đĩa Petri (cm²)</i>	<i>Số nhân để tính số VSV/m³ không khí</i>
8	50	100
9	63	80
10	78	60

Ví dụ: Đĩa Petri có S = 50 cm² mọc lên 20 khuẩn lạc. Vậy số lượng vi sinh vật trong 1 m³ không khí sẽ là: $20 \times 100 = 2.000$ CFU hay 2.000 tế bào vi sinh vật.

Cách thứ ba: Xác định độ nhiễm bẩn của không khí theo phương pháp Ginoscova:

Dùng môi trường theo dõi tượng nghiên cứu. Ví dụ dùng MT thạch máu – tìm vi khuẩn tan máu; thạch thường và thạch Sabouraud – tìm vi nấm...

Đặt đĩa Petri đã có MT dinh dưỡng vào 5 vị trí của phòng giữa và 4 góc, mở đĩa Petri 5 và 10 phút, đặt các đĩa Petri trên tủ âm 37 °C, ủ âm 24 – 48 giờ rồi lấy ra đếm số khuẩn lạc.

* Kết quả và tiêu chuẩn

- Không khí sạch: Mở hộp trong không khí 5 phút có < 5 khuẩn lạc.
- Không khí vừa: 10 phút có 20 – 25 khuẩn lạc.
- Không khí xấu: 10 phút có > 25 khuẩn lạc.

3.3. Đếm số lượng vi sinh vật bằng khung đếm Goriaep (Phòng đếm hồng cầu)

Chuẩn bị: dịch nuôi cây nấm men *S. cerevisiae* 2 ngày tuổi và khung đếm Goriaep dùng để xác định số lượng VSV có kích thước tế bào tương đối lớn như nấm men, bào tử nấm mốc, các loại vi tảo.

Nguyên tắc cấu tạo: Khung đếm là một lam kính hình chữ nhật, giữa là phần lõm phẳng, tại đây có kẻ một lưới gồm 400 hình vuông có diện tích tổng cộng là 1 mm². Vì vậy diện tích một hình vuông nhỏ là 1/400 mm² và một hình vuông lớn hơn là 1/25 mm².

Cách đếm:

- Pha loãng dịch nấm men *S. cerevisiae* 2 ngày tuổi từ 10⁻¹ – 10⁻⁶ tùy theo số lượng nấm men trong dịch nuôi.
- Nhỏ một giọt dịch nấm men vào giữa khung đếm và đậy bằng lamen.
- Quan sát và đếm số tế bào nấm men trong 80 ô vuông nhỏ chia cho 80 để tính số trung bình tế bào VSV đếm được trong 1 ô vuông nhỏ.

Tính số lượng tế bào 1 ml dịch nuôi theo công thức:

$$N = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot s} \cdot n$$

N: tổng số tế bào trong 1 ml dịch huyền phù;

a: số tế bào trung bình trong 1 ô vuông nhỏ;

h: chiều sâu của khung đếm 0,1 mm ;

n: hệ số pha loãng của mẫu (dịch huyền phù);

s: diện tích hình vuông của lưới 1/400 mm².

Để tính số lượng VSV trong 1ml dịch nuôi ($1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$) thì nhân nó với 1000.

(Hay N là số lượng VSV trong 1ml dịch nuôi = số VSV bình quân ở một ô vuông nhỏ $\times 4000 \times 1000 \times$ hệ số pha loãng).

3.4. Đếm số lượng tế bào sống

Số lượng tế bào sống trong các cơ chất phân lập trên môi trường dinh dưỡng đặc được biểu thị bằng đơn vị CFU. Một CFU là một khuẩn lạc phát triển từ một tế bào (hay bào tử) lúc ban đầu của một loại VSV trên môi trường dinh dưỡng thạch mà mắt thường có thể nhìn thấy).

Cách đếm: Tiến hành như bài phương pháp phân lập VSV đất trên môi trường thạch. Sau khi nuôi cấy ở nhiệt độ và thời gian thích hợp trong tủ âm, đem ra đếm số khuẩn lạc trung bình mọc được trên mỗi đĩa thạch, từ đó tính ra số lượng tế bào trong 1 g (hay 1 ml) cơ chất lúc đầu theo công thức:

$$N = 10 \times a \cdot Df/W$$

N: số lượng VSV/g (hay 1 ml) cơ chất;

a: số khuẩn lạc trung bình đếm được trong 1 đĩa Petri;

$10 \times a$: số CFU trong 1 ml dịch nghiên cứu ở độ pha loãng (n);

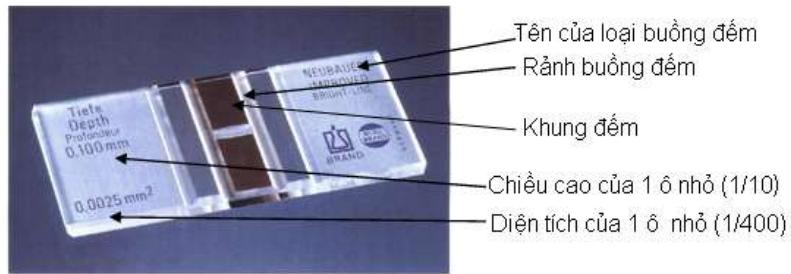
Df: độ pha loãng của mẫu nghiên cứu;

W: trọng lượng khô của 1 g mẫu nghiên cứu.

Ví dụ: Khi cấy 0,1 ml dịch đất ở độ pha loãng 10^{-6} , ta đếm được 35 CFU/1đĩa thạch. Nếu biết rằng trọng lượng khô của 1 g đất là 0,95 g. Tổng số CFU/g được tính:

$$N = 10 \times 35 \times 10^6 : 0,95 = 36,8 \cdot 10^7$$

Chú ý: Nếu số CFU/1đĩa thạch nhỏ hơn 10 thì kết quả phải loại bỏ, tốt nhất là từ 30 – 300 CFU/đĩa thạch.



Hình 23. Buồng đếm té bào vi sinh vật.

3.5. Đếm số lượng theo phương pháp pha loãng tối hạn (MPN)

a) *Nguyên tắc:* Phương pháp MPN (Most Probable Number – phương pháp có số xác suất cao nhất; số tối khả) còn được gọi là phương pháp pha loãng tìm giới hạn phát triển. Đây là phương pháp dùng để đánh giá số lượng VSV theo số lượng VSV có xác suất lớn nhất hiện diện trong một đơn vị thể tích mẫu. Đây là phương pháp định lượng dựa trên kết quả định tính của một loạt thí nghiệm được lặp lại ở một số độ pha loãng khác nhau. Phải chọn giới hạn pha loãng thế nào để đảm bảo ở độ pha loãng thấp nhất luôn phát hiện thấy *Coliform*, còn ở độ pha loãng cao nhất hoàn toàn không phát hiện thấy. Ví dụ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} hoặc $10^{-3} - 10^{-7}$. Thông thường việc định lượng này được thực hiện lặp lại 3 hay 5 lần ở 3 độ pha loãng bậc 10 liên tiếp, tổng cộng $3 \times 5 = 15$ ống nghiệm.

2) *Quy trình thực hiện định lượng* theo phương pháp này như sau: Cho vào các ống nghiệm có chứa môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của đối tượng VSV cần định lượng một thể tích chính xác dung dịch mẫu ở 3 nồng độ pha loãng bậc 10 liên tiếp (ví dụ 1/10, 1/100, 1/1000...). Ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp. Dựa vào kết quả biểu kiến chứng minh sự tăng trưởng của VSV cần kiểm định trong từng ống nghiệm (thường là các hiện tượng như sinh hơi, đổi màu, đặc...), ghi nhận số lượng các ống nghiệm dương tính ở từng độ pha loãng. Sử dụng các số liệu này và dựa vào bảng Mac Crady suy ra mật độ VSV được trình bày dưới dạng số MPN/100 ml hay số MPN/1 g mẫu. Độ chính xác của trị số MPN phụ thuộc vào số lượng ống nghiệm lặp lại trong mỗi độ pha loãng.

Phương pháp MPN có thể dùng để định lượng bất kỳ loại VSV nào bằng cách nuôi cấy chúng trên môi trường tăng sinh chọn lọc (môi trường lỏng).

3) *Đếm Coliforms* trong thực phẩm hỏng, nước thải sinh hoạt:

a) Chuẩn bị môi trường LSB và BGBL

+ Môi trường Lauryl Sulfate Broth (LSB) (pH 7,4)

Công thức:

Tryptose	20 g	K ₂ HPO ₄	2,75 g
Lactose	5 g	Lauryl sulfate	0,1 g
Sodium chloride	5 g	KH ₂ PO ₄	2,75 g
Nước cất	1000 ml		

Cách pha ché: Hòa tan các chất vào 1000 ml, chỉnh pH khoảng 7,4. Rót vào ống nghiệm có ống Durham 10 ml môi trường LSB. Hấp 121 °C, 1 atm trong 15 phút.

+ Môi trường Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGBL) (pH 7,4):

Công thức:

Peptone 10 g

Lactose 10 g

Mật bò 20 g

Brilliant green 0,0133 g

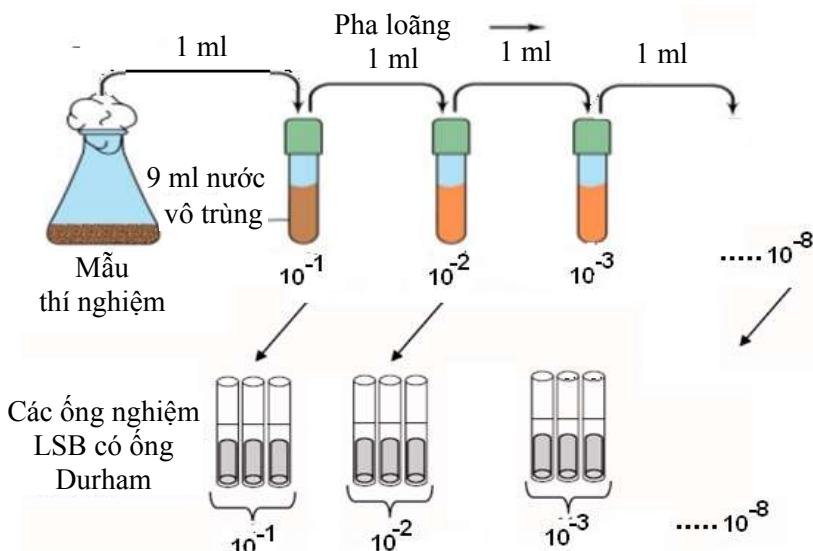
Nước cát 1000 ml

Cách pha ché: Hòa tan peptone và lactose trong 500 ml nước cát, sau đó cho khoảng 200 ml mật bò vào, hòa 0,0133 g brilliant green vào trong khoảng 100 ml nước cát. Trộn đều 3 dung dịch và thêm nước đủ 1000 ml, chỉnh pH khoảng 7,4. Rót vào ống nghiệm có ống Durham 10 ml môi trường BGBL. Hấp 121 °C, 1 atm trong 15 phút.

b) *Tiến hành đếm Coliforms trong nước thải*

Bước 1: Lấy mẫu nước thải và pha loãng từ 10^{-1} – 10^{-8} (tùy độ bẩn của nước thải).

Bước 2: Rót môi trường dinh dưỡng Lauryl Sulfate Broth (LSB) hay môi trường nước thịt – peptone hoặc môi trường Savouraud dạng dịch thê (không có agar) vào 15 ống nghiệm mỗi ống 10 ml đặt vào giá.



Hình 24. Sơ đồ xác định số lượng Coliforms trong nước thải.

Bước 3: Chọn 3 nồng độ pha loãng liên tiếp thích hợp. Mỗi độ pha loãng hút 3 lần, mỗi lần 1 ml cấy vào 3 ống nghiệm môi trường LSB. Hút 3 nồng độ liên tiếp (ví dụ: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), mỗi nồng độ 1 ml/10 ml, Thí nghiệm được lặp lại 5 ống nghiệm/một nồng độ pha loãng (hay mỗi độ pha loãng cấy vào 5 ống).

Để kiểm tra khả năng sinh khí ta làm như sau: trộn đều mẫu nước thải và môi trường dinh dưỡng rót vào ống durham (ống nghiệm nhỏ kích thước $0,5 \times 4$ cm) cho đầy ống, nhẹ nhàng cho ống nghiệm nhỏ lòng vào ống nghiệm to, sao cho không có bọt khí.

Bước 4: Ủ ám từ 35 – 37 °C, thời gian 24 – 48 giờ.

Bước 5: Ông dương tính là môi trường bị vẫn đục và có bọt khí trong ống durham.

Bước 6: Tra bảng Mac Crady – loạt 5 ống nghiệm ở 3 nồng độ liên tiếp.

Lưu ý: Các ống nghiệm có khả năng hiện diện của coliform là dương tính cả hai môi trường LSB và BGBL.

Chỉ số phân tích sẽ là 531. Tra ở bảng Mac Crady sẽ tìm thấy chỉ số số lượng là 11. Độ pha loãng thấp nhất của chỉ số là 1/1000. Vì vậy số lượng VSV trong 1 ml dịch nghiên cứu (hoặc 1 gam đất nghiên cứu) sẽ là: $11,0 \times 1000 = 11000$.

Bảng 2. Mac crady – mỗi độ pha loãng cấy vào 5 ống

Chỉ số phân tích	Chỉ số số lượng	Chỉ số phân tích	Chỉ số số lượng	Chỉ số phân tích	Chỉ số số lượng	Chỉ số phân tích	Chỉ số số lượng	Chỉ số phân tích	Chỉ số số lượng	Chỉ số phân tích	Chỉ số số lượng
000	0,0	122	1,0	301	1,1	410	1,7	510	3,5	542	25,0
001	0,2	130	0,8	302	1,4	411	2,0	511	4,5	543	30,0
002	0,4	131	1,0	310	1,1	412	2,5	512	6,0	544	35,0
010	0,2	140	1,1	311	1,4	420	2,0	513	8,5	545	45,0
011	0,4	200	0,5	312	1,7	421	2,5	520	5,0	550	25,0
012	0,6	201	0,7	313	2,0	422	3,0	521	7,0	551	35,0
020	0,4	202	0,9	320	1,4	430	2,5	522	9,0	552	80,0
021	0,6	203	1,2	321	1,7	431	3,0	523	12,0	553	90,0
030	0,6	210	0,7	322	2,0	432	4,0	524	15,0	554	160
100	0,2	211	0,9	330	1,7	440	3,5	525	17,5	555	180
101	0,4	222	1,2	331	2,0	441	4,9	530	8,0		
102	0,6	220	0,9	310	2,0	450	4,0	531	11,0		
103	0,8	221	1,2	341	2,5	451	5,0	532	14,0		
110	0,4	232	1,4	350	2,5	500	2,5	533	17,5		
111	0,6	230	1,2	400	1,3	501	3,0	534	20,0		
112	0,8	231	1,4	301	1,7	502	4,0	535	25,0		
120	0,6	210	1,4	402	2,0	503	6,0	540	13,0		
121	0,8	300	0,8	103	2,5	504	7,5	541	17,0		

Ví dụ:

Độ pha loãng	1/100	1/1000	1/10.000	1/100.000	1/1000.000
Số ống MT cấy từ mỗi độ pha loãng	5	5	5	5	5
Số ống MT có phản ứng dương tính	5	5	3	1	0

3.6. Phương pháp đo độ đục

Khi một pha lỏng có chứa nhiều phần tử không tan thì sẽ hình thành một huyền phù và có độ đục bởi các phần tử hiện diện trong môi trường lỏng làm cản ánh sáng, làm phân tán chùm ánh sáng tới. Tế bào VSV là một thực thể nên khi hiện diện trong môi trường cũng làm môi trường trở nên đục. Độ đục của huyền phù tỷ lệ với mật độ tế bào. Trong một giới hạn nhất định của độ đục và mật độ tế bào, có thể xác lập được quan hệ tỷ lệ tuyến tính giữa mật độ tế bào và độ đục. Do vậy, có thể định lượng mật độ tế bào một cách gián tiếp thông qua đo độ đục bằng máy so màu ở các bước sóng từ 550 – 610 nm. Trong trường hợp này, trước tiên cần phải thiết lập được đường quan hệ tuyến tính giữa độ đục và mật độ tế bào bằng cách sử dụng một số huyền phù tế bào có độ đục xác định bằng một phương pháp trực tiếp khác, ví dụ như phương pháp đếm khuẩn lạc, phương pháp đếm trực tiếp...

** Xây dựng đường tương quan tuyến tính giữa độ đục và mật độ tế bào*

Pha loãng một dịch huyền phù chứa loại VSV cần kiểm nghiệm có mật độ bất kì thành các huyền phù khác nhau có độ đục đo ở OD610 nm đạt các giá trị lân cận 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; và 0,5. Đo OD610 nm của các huyền phù vừa được pha, ghi nhận số đo thực tế.

– Dùng phương pháp đếm trực tiếp dưới kính hiển vi hoặc phương pháp đếm khuẩn lạc, xác định mật độ tế bào (N/ml) của các huyền phù này.

– Tính giá trị log(N/ml) cho mỗi giá trị mật độ N/ml tương ứng với mỗi mật độ đục. Vẽ đường biểu diễn của log(N/ml) (trục tung) theo OD610nm (trục hoành). Xác định khoảng tuyến tính giữa log(N/ml) và OD610 nm.

** Xác định mật độ tế bào theo độ đục*

– Đo độ đục của một huyền phù tế bào X cần xác định mật độ.

– Từ trị số OD610nm đo được, dựa vào đường tương quan giữa log(N/ml) và độ đục OD610nm, suy ra trị số log(N/ml) và trị số mật độ N/ml ($N/ml = 10^a$ với $a = \log(N/ml)$).

Phương pháp này có thể được dùng để so sánh mức độ tăng trưởng của hai hay nhiều chủng VSV trong môi trường lỏng. Trong trường hợp không cần biết giá trị tuyệt đối của mật độ tế bào thì không cần phải xây dựng đường tương quan tuyến tính giữa độ đục và mật độ. Phương pháp này cho kết quả nhanh thường được ứng dụng trong theo dõi hoặc

nghiên cứu đặc trưng tăng trưởng của các chủng vi sinh vật trong PTN hoặc trong sản xuất, tuy nhiên nó không thích hợp cho ứng dụng trong kiểm nghiệm vi sinh vật.

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. Cách sử dụng thước đo thị kính OLYPUS: thị kính ($\times 10$), vật kính ($\times 40$)?
2. Nguyên tắc và phương pháp đo kích thước tế bào nấm men với tiêu bản giọt ép? Khi đo kích thước tế bào vi sinh vật cần lưu ý những điểm gì? Vì sao?
3. Nguyên tắc và các bước tiến hành đếm số lượng vi sinh vật trong 1 m^3 không khí?
4. Nêu nguyên tắc và các phương pháp đếm số lượng vi sinh vật có trong 1 ml nước thải?
5. Nêu nguyên tắc và các bước đếm số lượng vi sinh vật hiếu khí có trong 1 g chất thải hữu cơ rắn theo phương pháp MPN?
6. Cho biết ưu và nhược điểm của phương pháp đếm số lượng bằng khung đếm Goriaep và đếm CFU/g?
7. Xác định số lượng tế bào vi khuẩn trong mẫu nước thải ở độ pha loãng 10^{-3} bằng cách đếm số lượng CFU trên môi trường thạch. Từ đó tính ra số lượng vi khuẩn trong 1 ml nước thải.
8. Nguyên tắc và các bước tiến hành xác định số lượng Coliforms trong 100 ml nước thải theo phương pháp MPN?
9. Nguyên tắc và các bước tiến hành xác định số lượng vi sinh vật trong 100 ml nước thải theo phương pháp đo độ đục?

BÀI 5. CÁC TÍNH CHẤT SINH HÓA CỦA VI SINH VẬT

I. NGUYÊN LÝ

Mỗi loại VSV đều có một quá trình chuyển hóa riêng. Để nhận biết và xếp loại VSV chúng ta phải xác định tính chất sinh hóa của chúng.

II. THỰC HÀNH

1. Mục tiêu

Nắm được nguyên tắc, kỹ thuật tiến hành và cách đọc kết quả các tính chất sinh hóa của vi sinh vật trong chất thải hữu cơ.

Biết cách làm các phản ứng sinh hóa đối với các vi sinh vật phân lập từ chất thải hữu cơ và đánh giá kết quả.

2. Chuẩn bị mẫu vật, dụng cụ, hóa chất, thuốc thử, môi trường

2.1. Vi sinh vật

- Vi khuẩn, vi nấm, xạ khuẩn phân lập từ phế thải hữu cơ để thử tính chất sinh hóa.
- Vi khuẩn mẫu (của PTN như vi khuẩn *E.coli*, *B.subtilis*...; vi nấm *Aspergillus oryzae*, *Penicillium notatum*...) có kết quả thử dương tính để đối chiếu.

2.2. Dụng cụ

Giấy thấm, lam kính sạch, pipette, ống hút, ống nghiệm, que cấy, giá ống nghiệm, giá cắm pipette, đèn cồn.

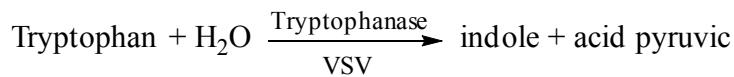
2.3. Hóa chất thuốc thử, môi trường

- Nước muối sinh lý, các loại thuốc thử dùng cho các phản ứng.
- Các loại môi trường nuôi cấy cần thiết.
- Các loại hóa chất cần thiết (theo từng thí nghiệm).

3. Các bước tiến hành

3.1. Phản ứng tìm indole

Indole là một phức chất có N do một số vi khuẩn phân giải tryptophan (một amino acid) tạo thành.



Cách pha thuốc thử Kovacs:

Công thức: Cồn isoamylic 150 ml
Para-dimethylaminobenzaldehyde 10 g
Acid chlohydric đặc 50 ml

Cách pha: Hòa para-dimethylaminobenzaldehyde trong cồn isoamylic, sau đó cho từ từ acid chlohydric đặc vào. Dung dịch này bảo quản trong tủ lạnh và tránh ánh nắng.

a) *Nguyên tắc:* Indol (benzyl pyrrole) là một sản phẩm chuyển hóa của tryptophan. Những vi khuẩn có enzyme tryptophanase có khả năng chuyển hóa tryptophan tạo ra indole. Dưới tác dụng của thuốc thử Kovacs, indol chuyển thành màu đỏ và nổi lên bề mặt.

b) *Chuẩn bị*: đủ dụng cụ, thuốc thử Kovacs, môi trường nước thịt – peptone, vi khuẩn.

c) *Tiến hành:*

– Cấy vi khuẩn đã phân lập vào môi trường nước thịt – peptone, để tủ âm 37°C trong 24 giờ. Nhỏ tiếp vài giọt thuốc thử Kovacs, rồi đọc kết quả.

d) *Đánh giá kết quả* (xem hình màu 25 trang 364)

+ Phản ứng dương tính: có vòng (quầng) đỏ nổi lên mặt môi trường.

+ Phản ứng âm tính: không có vòng đỏ nổi trên mặt môi trường.

* *Lưu ý:*

Indole (+): *E.coli*.

Indole (-): Hầu hết các vi khuẩn trong nhóm *Klebsiella* – *Enterobacter* – *Hafnia* – *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*.

3.2. Đánh giá khả năng sinh H_2S

a) *Nguyên tắc:* Những vi khuẩn có hệ thống enzyme sinh H_2S thì có khả năng giải phóng sulfide từ cystein hoặc thiosulfat. Sulfide sẽ kết hợp với ion hydrogen (H^{+}) tạo thành H_2S . Trong môi trường có muối kim loại nặng (sắt acetate, chì acetate), H_2S sẽ kết hợp với chất này tạo thành sulfur sắt hoặc sulfua chì có màu đen.

b) *Chuẩn bị:* đủ dụng cụ, môi trường thạch chì, vi khuẩn.

c) *Tiến hành:*

* *Môi trường:* KIA, môi trường SS, môi trường thạch chì (pH 7,0).

– *Môi trường Kligler (KIA) (pH 7,4):*

+ Cao thịt 3 g

Lactose 10 g

+ Cao men 3 g

Glucose 1 g

+ Peptone 20 g

Đỏ phenol, dung dịch 0,5% 6 ml.....	0,05 g
+ NaCl.....	5 g
Thạch (agar).....	12 g
+ Feric citrate.....	0,5 g
Nước cất.....	1000 ml
+ Na ₂ SO ₃	0,5 g
pH.....	7,4

Pha ché: Cân đong đủ các thành phần của MT. Cho thạch vào nước đun, khuấy cho tan. Lần lượt cho thêm các hóa chất vào để hòa tan. Điều chỉnh pH 7,4 rồi thêm 6 ml dung dịch đỏ phenol 0,5%, khuấy đều. Rót vào các ống nghiệm 12 mm, mỗi ống 3 ml, hấp 110 °C trong 30 phút. Lấy ra để ống MT nằm nghiêng sao cho mặt nghiêng dài khoảng 2 cm.

– *Môi trường thạch chì có thành phần (g/l):* Nutrient agar 23 g, Na₂S₂O₃ 2,5 g, Acetate chì Pb(CH₃COOH)₂ 10% 5 ml, nước cất 1000 ml.

– *Pha ché:* Hòa tan các thành phần MT trên vào nước cất. Đun cho tan đều thạch rồi thêm Na₂S₂O₃ sau đó trộn đều rồi khử trùng ở 121 °C/15 – 20 phút. Lấy ra đợi nguội khoảng 45 °C, thao tác vô trùng bỗ sung 5 ml dung dịch chì 10% trộn đều, rót vào ống nghiệm mỗi ống 5 ml, đợi cho đông lại.

– Cây vi khuẩn đã phân lập vào MT thạch chì, để tủ ấm 37 °C trong 24 giờ.

d) Đánh giá kết quả (xem hình màu 26 trang 364):

(+) Dương tính sinh H₂S xuất hiện màu đen trong môi trường.

(-) Âm tính không sinh H₂S không xuất hiện màu đen trong môi trường.

* *Giải thích:* Vi khuẩn (MT có acid) + Sodium thiosulfate → H₂S gas ↑



3.3. Xác định sự phân giải urea

Nguyên tắc: Urea là diamide của acid carbonic. Những loài vi khuẩn có enzyme urease có khả năng chuyển hóa urea thành sản phẩm kiềm amoniac, làm tăng pH của môi trường, dẫn đến làm thay đổi màu của chỉ thị màu.

Tiến hành: Có thể dùng môi trường urea lỏng hoặc môi trường thạch ống nghiêng (urea christensen). pH môi trường là 6,8, chỉ thị màu: đỏ phenol.

Cây vi khuẩn thử vào môi trường, ủ 37 °C/24 giờ.

Kết quả:

+ Môi trường urea lỏng: từ màu đỏ, môi trường chuyển sang màu đỏ cánh sen là thử nghiệm dương tính.

+ Môi trường thạch urea christensen: môi trường chuyển từ màu vàng sang màu đỏ là thử nghiệm dương tính.

+ Người ta còn có thể chỉ tạo môi trường hỗn hợp để phát hiện đồng thời Ure – Indol trên cơ sở các nguyên lý phản ứng trên.

1) *Môi trường đặc urea christensen (pH 7,2):*

Peptone bột.....	1 g	NaCl.....	5 g	
K ₂ HPO ₄	2 g	Thạch (agar)	20 g	
Nước cất	1000 ml			

Cho tất cả vào bình cầu, đun cho thạch và hóa chất tan. Cho thêm 1 g glucose, điều chỉnh pH 7,2. Sau đó cho 3 ml dung dịch đở phenol 4%. Phân phổi môi trường vào ống nghiệm. Hấp 110 °C trong 30 phút, lấy ra để nguội 50 °C. Dùng pipette vô trùng hút cho vào mỗi ống thạch 0,5 ml dung dịch urea 20%.

2) *Môi trường urea Indol (pH 7,2):*

Công thức:

L-Tryptophan	3 g	KH ₂ PO ₄	1 g	
K ₂ HPO ₄	1 g	NaCl.....	5 g	
Urea	20 g	Dung dịch đở phenol trong cồn 2 ml		
Nước cất	1000 ml			

Cách pha chế: Cho tất cả vào bình cầu, đun nóng 50 – 60 °C để hòa tan các chất, điều chỉnh pH 7,2. Sau đó cho 2 ml dung dịch đở phenol (hòa 0,25 g đở phenol trong 50 ml cồn 95° rồi thêm 50 ml nước cất). Lọc qua Seitz rồi phân phổi môi trường vào ống nghiệm mỗi ống 1 – 2 ml (nếu không có lọc Seitz thì không lọc cũng được, nhưng phải pha chế vô khuẩn hoặc có thể hấp 75 °C trong 1 giờ, hôm sau 65 °C/30 phút).

a) *Nguyên tắc:* Sử dụng để phát hiện khả năng phân cắt urea thành ammonia do hoạt tính của urease từ VSV và kết quả là môi trường bị kiềm hóa do NH₃ được tạo ra.

b) *Chuẩn bị:* đủ dụng cụ, môi trường đặc urea christensen và môi trường lỏng urea indole, vi khuẩn.

c) *Tiến hành:* Cấy vi khuẩn đã phân lập vào môi trường đặc urea christensen và môi trường lỏng urea indole, để tủ âm 37 °C trong 24 giờ.

d) *Đánh giá kết quả (xem hình màu 27 trang 364):*

- + Nếu MT chuyển sang màu đỏ cánh sen là phản ứng dương tính.
- + Nếu MT vẫn giữ màu cũ là phản ứng âm tính.

3.4. *Tìm khả năng lên men carbohydrate*

Một số VSV phân giải đường sinh ra acid. Phát hiện độ acid bằng các chỉ thị màu cho vào môi trường đó. Trong trường hợp lên men đường, chỉ thị màu chuyển màu và có thể sinh khí hoặc không.

– *Dùng MT Basiekow:* Môi trường Basiekow có chất chỉ thị màu là xanh bromthymol. Để xác định xem vi khuẩn có khả năng lên men một loại đường nào đó hay không thì

người ta sẽ cho loại đường cần xác định (glucose, lactose, arabinose...) vào môi trường này. Sau đó cấy vi khuẩn vào môi trường, để ở nhiệt độ 37 °C trong 24 giờ. Nếu vi khuẩn lên men đường sẽ sinh ra acid và làm cho pH của môi trường thay đổi, chỉ thị màu chuyển từ màu xanh sang màu vàng. Nếu môi trường không thay đổi màu sau khi nuôi cấy vi khuẩn trong 24 giờ thì vi khuẩn đó có thể không có khả năng sử dụng đường hoặc sử dụng theo con đường oxy hóa.

* Môi trường Basiekow (pH 7,2):

Cao thịt 5 g

Peptone 10 g

NaCl tinh khiết 5 g

Dung dịch xanh bromthymol 1,5% trong cồn 15 ml.

Cách pha chế: Cân đong đầy đủ các thành phần của môi trường vào bình cầu. Đun nóng, khấy đều để hòa tan các chất. Điều chỉnh pH 7,2. Thêm 15 ml xanh bromthymol 1,5%, MT có màu xanh lá cây. Lọc qua giấy lọc, phân phôi vào 9 ống nghiệm, mỗi ống 3 ml và một ống hơi. Khử trùng 110 °C trong 30 phút. Khi dùng thì cho thêm mỗi ống 0,2 ml dung dịch đường định thử (glucose, lactose, arabinose...).

– *Dùng MT Kligler:* Kligler là MT tổng hợp có hai loại đường là glucose và lactose. Nuôi cấy VSV vào MT, để nhiệt độ 37 °C/24 giờ. Nếu lên men đường, MT chuyển từ màu đỏ sang màu vàng.

a) *Nguyên tắc:* Xác định khả năng lên men của VSV đối với nguồn carbohydrate cụ thể (glucose, lactose, xylose...) kết hợp với môi trường kiểm tra khả năng sinh acid hoặc sinh acid và sinh hơi.

b) *Chuẩn bị:* đủ dụng cụ, môi trường KIA và môi trường Basiekow đã có các loại đường định thử (1% lactose, 1% saccharose, 0,1% glucose) và vi khuẩn.

c) *Tiến hành:* Cấy vi khuẩn đã phân lập vào môi trường KIA và môi trường Basiekow. Để tủ âm 37 °C trong 24 giờ.

d) *Đánh giá kết quả (xem hình màu 28 trang 364):*

+ *Môi trường Basiekow* chuyển từ màu xanh sang màu vàng là vi khuẩn lên men đường.

+ *Môi trường Kligler (KIA):*

Có ba trường hợp:

(1) Nếu phần đứng + phần nghiêng đỏ (kiềm): Không lên men đường.

(2) Phần đứng vàng (acid) + phần nghiêng đỏ (kiềm): Lên men glucose, Không lên men lactose.

(3) Cả hai phần đều vàng (acid): lên men cả glucose và lactose.

3.5. Phản ứng đỏ methyl RM (Rouge methyle) và V.P. (Voges proskauer)

Người ta thường dùng MT Clark – Lubs để xác định bằng hai phản ứng.

1) Phản ứng đỏ methyl (RM)

- Chuẩn bị đủ dụng cụ, thuốc thử đỏ methyl, môi trường Clark – Lubs và vi khuẩn.
- Cấy vi khuẩn vào MT Clark – Lubs, để tủ âm 37 °C trong 4 ngày.
- Nhỏ 5 giọt thuốc thử đỏ methyl vào.
- Đánh giá kết quả (*xem hình màu 29 trang 364*):
 - + Nếu màu đỏ xuất hiện là phản ứng dương tính.
 - + Nếu màu vàng xuất hiện là phản ứng âm tính.

Cách pha dung dịch đỏ methyl:

- + Đỏ methyl 0,1 g
- + Cồn 95° 500 ml

Hòa cho tan rồi thêm nước cất vừa đủ 500 ml.

2) Phản ứng (Voges proskauer) V.P.

Nguyên tắc: Xác định khả năng của một số VSV tạo sản phẩm chuyển hóa trung gian là acetyl methyl carbinol (AMC) do lên men glucose.

Chuẩn bị: đủ dụng cụ, thuốc thử đỏ methyl, môi trường Clark – Lubs và vi khuẩn.

- Cấy vi khuẩn phân lập vào MT Clark – Lubs, để tủ âm 37 °C trong 4 ngày.
- Nhỏ vào môi trường 5 giọt dung dịch A và 5 giọt dung dịch B lắc nhẹ.
- Đánh giá kết quả (*xem hình màu 30 trang 364*):
 - + Nếu môi trường có màu đỏ nâu là phản ứng dương tính.
 - + Nếu môi trường có màu vàng nhạt là phản ứng âm tính.

Cách pha thuốc thử phản ứng V.P.:

- + Dung dịch A: α-naphtol 6% trong cồn 90°, để tủ lạnh trước khi dùng.
- + Dung dịch B: NaOH 16% trong nước.

3.6. Khả năng sử dụng citrate

Trong một số MT nghèo chất dinh dưỡng, VSV có thể sử dụng được natri citrate thì các chất này sẽ bị chuyển hóa tới giai đoạn khí carbonic đưa tới hiện tượng kiềm hóa môi trường bởi sự mất cân bằng về ion. Môi trường bị kiềm hóa chuyển màu xanh. Một vài VSV citrate âm tính có thể cho khuẩn lạc rất nhỏ màu vàng nhạt. Môi trường dùng để nuôi cấy vi khuẩn thường là Simmons.

Môi trường citrate Simmons (pH 7,2):

NaCl	5 g	Magie sunfate	0,2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g	K ₂ HPO ₄	1 g

Natri citrate	2 g	Thạch (agar)	20 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml		

Dung dịch xanh bromothymol 1,5% trong cồn 90⁰ 10 ml

Pha ché: Cân, đong đủ thành phần MT vào bình cầu. Đun sôi nhỏ lửa, khuấy đều cho tới khi tan hết. Điều chỉnh pH 7,2 thêm dung dịch xanh bromothymol, môi trường có màu xanh lá cây. Phân phối vào ống 60 nghiệm mỗi ống 3 ml. Hấp 110 °C/30 phút, đem ra để nghiêng cho MT đông lại.

a) *Nguyên tắc:* Xác định khả năng sử dụng citrate như là nguồn carbon duy nhất trong quá trình biến dưỡng của VSV.

b) *Chuẩn bị:* đủ dụng cụ, môi trường Simmons và vi khuẩn.

c. *Tiến hành:* Nuôi cây vi khuẩn đã phân lập vào môi trường Simmons, để tủ ám 37 °C trong 24 giờ.

d) *Đánh giá kết quả* (xem hình màu 31 trang 365):

+ Môi trường chuyển từ màu xanh lá cây sang màu xanh nước biển là phản ứng dương tính

+ Nếu môi trường vẫn giữ nguyên màu là phản ứng âm tính.

3.7. Phản ứng catalase

a) *Nguyên tắc:* Catalase là một enzyme thủy phân hydrogen peroxide (H₂O₂) thành H₂O và O₂.



b) *Thuốc thử:* hydrogen peroxide (H₂O₂) 3% trong lọ màu nâu, bảo quản trong tủ lạnh.

c) *Tiến hành:*

– Nuôi VSV cần xác định trên môi trường thạch đĩa hay thạch nghiêng cho mọc thành khuẩn lạc trước 18 – 24 giờ.

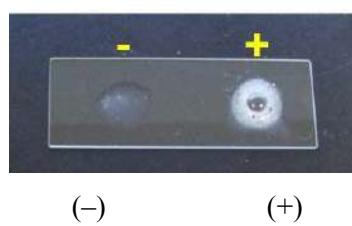
– Nhỏ một giọt oxy già (H₂O₂) lên lam kính.

– Dùng que cấy gạt khuẩn lạc trộn vào giọt oxy già.

d) *Đánh giá kết quả*

+ Nếu có hiện tượng sủi bọt nhìn thấy bằng mắt thường là phản ứng dương tính.

+ Nếu không thấy hiện tượng gì là phản ứng âm tính.



Hình 32. Phát hiện enzyme catalase của vi sinh vật nghiên cứu.

(xem hình màu 32 trang 365).

* Chú ý: Catalase (+) mạnh với *Proteus*, *Serratia*, dương tính vừa với *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, dương tính yếu với *Shigella*, *Escherichia*.

3.8. Phản ứng oxydase

a) Nguyên tắc: Xác định sự hiện diện của enzyme oxidase (cytochrome oxidase system). Thử nghiệm này dùng để phát hiện những vi khuẩn có cytochrome oxidase.

b) Chuẩn bị: đồ dụng cụ, giấy thấm, vi khuẩn và thuốc thử Kovacs oxidase (1% tetra-methyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, pha trong nước). Giữ lạnh trong chai tối màu tối đa trong 1 tuần.

Chủng vi sinh vật: Vi khuẩn, xạ khuẩn, vi nấm phân lập từ rác thải.

c) Tiến hành:

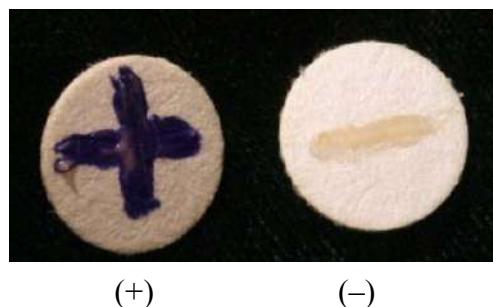
– Ngâm miếng giấy thấm trong thuốc thử chứa 1% Kovacs oxidase và để cho khô.

– Sử dụng que cây lấy khuẩn lạc từ đĩa thạch (khuẩn lạc nuôi cây trong vòng 18 – 24 h) chấm lên bề mặt giấy thấm.

d) Đánh giá kết quả: bằng cách quan sát sự thay đổi màu sắc.

+ Miếng giấy thấm chuyển sang màu tím trong vòng 5 – 10 giây là phản ứng (+) dương tính.

+ Nếu miếng giấy thấm không thay đổi màu là phản ứng (-) âm tính.



Hình 33. Thí nghiệm xác định oxydase.

* Các loài vi khuẩn có oxidase (-): Các vi khuẩn đường ruột, *Acinetobacter*, thử nghiệm oxidase rất hay dùng để phân biệt vi khuẩn đường ruột với các vi khuẩn khác

3.9. Phản ứng ONPG-ase (*O-nitrophenyl-β-D-galactopyranosidase*)

Môi trường:

ONPG 0,6 g

Đệm phosphat 0,01M pH 7,5 100 ml

Dung dịch pepton 1% (pH 7,5) 300 ml

Hòa 0,6 g ONPG trong 100 ml dung dịch đệm, khử trùng bằng màng lọc, sau đó trộn với 300 ml dung dịch pepton đã khử trùng.

Bằng thao tác vô khuẩn phân môi trường vào các ống nghiệm nhỏ, bảo quản ở 4 °C trong vòng 1 năm.

Cắt những khoanh giấy lọc, khử trùng 112 °C, 30 phút.

Nhỏ vào mỗi khoanh giấy lọc một giọt dung dịch sau:

ONPG 0,06 g

Na₂HPO₄.2H₂O 0,017 g

Nước cất 10 ml

Làm khô ở 37 °C trong 24 giờ, bảo quản trong các ống nghiệm có nút xoáy ở nhiệt độ phòng.

Cây vi khuẩn mới hoạt hóa (1 vòng que cây) vào môi trường đã chuẩn bị như trên, đặt ở nhiệt độ thích hợp trong 24 giờ.

Ly tâm dịch nuôi cây thu tết bào, làm dịch huyền phù đậm đặc trong 0,5 ml nước muối sinh lý.

Đưa khoanh giấy ONPG vào dịch huyền phù, giữ ở 35 – 37 °C trong 24 giờ.

Quan sát kết quả: màu vàng là phản ứng dương tính (*Escherichia coli*); không màu là âm tính (*Salmonella paratyphi* B).

3.10. Xác định khả năng di động

a) *Nguyên tắc*: Vi khuẩn di động được nhờ roi (lông), khả năng di động của vi khuẩn được quan sát trong môi trường thạch mềm (nồng độ thạch 0,3 – 0,4%).

b) *Chuẩn bị* đủ dụng cụ, vi khuẩn và MT thạch mềm Manite – di động chứa 0,35% agar.

c) *Tiến hành*:

– Chuẩn bị môi trường thạch mềm (pH 7,2): Môi trường có thành phần (g/l): Nutrient broth 13 g, agar 5 g, nước cất 1000 ml. Đem các thành phần trên hòa tan vào nước cất, đun cách thủy cho hòa tan đều, phân vào các ống nghiệm 16 × 120 mm, mỗi ống nghiệm khoảng 5 ml. Hấp 110 °C trong 15 phút, lấy ra để nguội cho đông lại.

– Dùng que cây thẳng lấy sinh khối từ khuẩn lạc thuần, cây đậm sâu xuyên vào giữa môi trường trong ống nghiệm chứa MT thạch mềm. Ủ ở nhiệt độ 37 °C/24 giờ.

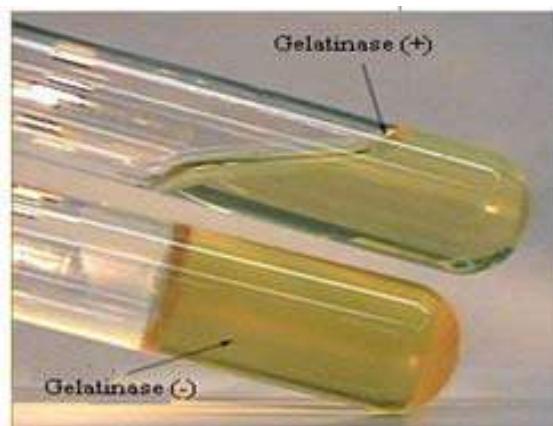
d) *Đánh giá kết quả* (hình 34)

– Dương tính: VSV mọc lan khỏi đường cây và làm đục môi trường xung quanh.

– Âm tính: VSV chỉ mọc quanh đường cây trong khi môi trường xung quanh vẫn trong.



Hình 34. Khả năng di động.



Hình 35. Khả năng phân giải gelatin.

3.11. Xác định khả năng làm tan chảy gelatin

a) Nguyên tắc:

Vi sinh vật sinh enzyme gelatinase sẽ thủy phân gelatin trong môi trường nuôi cấy tạo ra hỗn hợp các amino acids riêng lẻ và làm tan chảy (hay hóa lỏng) môi trường.

b) Chuẩn bị môi trường gelatin: Nutrient broth 13 g, gelatin 150 g, nước cất 1000 ml. Đem các thành phần trên hòa tan vào nước cất, đun cách thủy cho gelatin hòa tan đều, phân vào các ống nghiệm (16 × 120) mm, mỗi ống nghiệm khoảng 5 ml. Hấp 110 °C trong 15 phút, lấy ra để nguội cho đông lại.

Chú ý: Gelatin ở dạng rắn khi ủ ở 20 °C hoặc thấp hơn và dạng lỏng khi ủ ở 35 °C hoặc lớn hơn. Gelatin chuyển từ dạng (trạng thái rắn) thành dạng lỏng khi ủ ở 28 °C. Vì thế, nếu ống gelatin được ủ ở 35 °C hoặc lớn hơn thì chúng phải được đặt vào tủ lạnh hay tủ mát trước khi đọc kết quả.

c) Tiến hành: Dùng que cấy lấy một ít sinh khối từ khuẩn lạc thuần của VSV cho vào MT trên khi đang nóng chảy 45 °C, xoay nhẹ ống để trộn đều vi sinh vật. Sau 24 – 48 giờ đem ra quan sát.

d) Đánh giá kết quả:

- Dương tính: tan chảy môi trường.
- Âm tính: môi trường ở dạng rắn (không tan chảy).

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. Để chứng minh khả năng phân giải protein của VSV, người ta cần thực hiện những phản ứng nào?
2. Chứng minh khả năng phân giải carbohydrate của VSV, người ta cần thực hiện những phản ứng nào?

Trả lời đúng hoặc sai các câu sau:

3. Tất cả vi khuẩn gây bệnh trong nước thải, chất thải rắn hữu cơ đều có khả năng sinh indole?
4. Phản ứng indole được tiến hành trên môi trường thạch thường?
5. Các vi khuẩn lên men đường đều sinh khí?
6. Thuốc thử Kovacs để kiểm tra sự phân giải urea?
7. Ở môi trường Simmons vi khuẩn sử dụng được natri citrate thì môi trường có màu xanh?

BÀI 6. LÊN MEN VÀ PHÂN GIẢI CÁC PHẾ THẢI HỮU CƠ

I. NGUYÊN LÝ

Lên men là quá trình nuôi cấy vi sinh vật trong các thiết bị lên men (nồi lên men) để tạo ra sinh khối (tăng sinh) hoặc thúc đẩy vi sinh vật tạo ra sản phẩm trao đổi chất (các hợp chất sinh hóa). Hiện nay lên men được hiểu là tất cả các quá trình chuyển hóa (biến đổi) do vi sinh vật thực hiện trong điều kiện kỵ khí (thiếu oxy) hay hiếu khí.

Đối với lên men khử phế thải: không có sản phẩm lên men. Quá trình lên men nhằm mục đích loại bỏ phế thải, ví dụ như lên men *Penicillium pinophilum* để loại bỏ thành phần lignin trong rác thải thành phần gỗ.

Sự chuyển hóa các phế thải hữu cơ là quá trình hữu cơ hóa và vô cơ hóa các hợp chất hữu cơ. Quá trình này chủ yếu là kết quả của những hoạt động sống VSV.

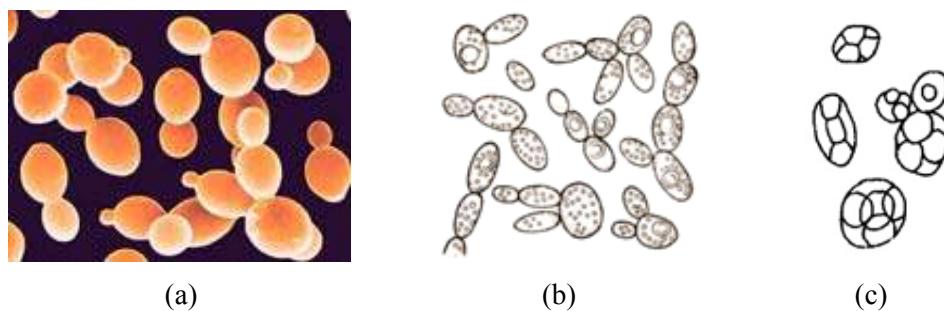
II. THỰC HÀNH

1. Mục tiêu

- Hiểu được vai trò của VSV trong quá trình lên men và phân giải các hợp chất hữu cơ trong các chất thải.
- Nắm được bản chất sinh học và hóa học của các quá trình lên men chính như lên men rượu, lên men lactic, lên men butyric.
- Biết cách thực hiện một số phản ứng định tính và nhận biết tác nhân VSV gây ra các quá trình chuyển hóa các hợp chất carbohydrate, protein trong phế thải hữu cơ.

2. Mẫu vật hóa chất và dụng cụ (theo từng thí nghiệm)

3. Các bước tiến hành



Hình 36. Nấm men.

a – *Saccharomyces cerevisiae* (Ian Robertset al., 2014);

b – *Saccharomyces vini* (×2000) (B. И. Кудрявцеву);

c – Té bào nấm men có bào tử.

3.1. Các quá trình lên men

3.1.1. Lên men rượu ethylic

a) *Nguyên tắc:* Lên men rượu ethylic là quá trình chuyển hóa đường glucose thành rượu ethylic và CO₂, đồng thời làm sản sinh ra một số năng lượng xác định dưới tác dụng của hệ thống enzyme zymase của một số vi sinh vật.

b) *Vi sinh vật lên men:* Quá trình lên men rượu chủ yếu là các nấm men, đặc biệt là các chi *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, một số loài nấm mốc (*Mucor*), một số loài vi khuẩn *Sarcina ventriculi*, *Zymomonas mobilis*.

c) Chuẩn bị trước dịch lên men rượu

Rót 100 ml dung dịch 10% glucose vào bình nón dung tích 250 ml vô trùng rồi cho vào đó 1 g KH₂PO₄; 1 g MgSO₄.7H₂O & 1g NaCl tinh khiết; 1 g nấm men dạng bột của Pháp hoặc 1 ống men thạch nghiêng.

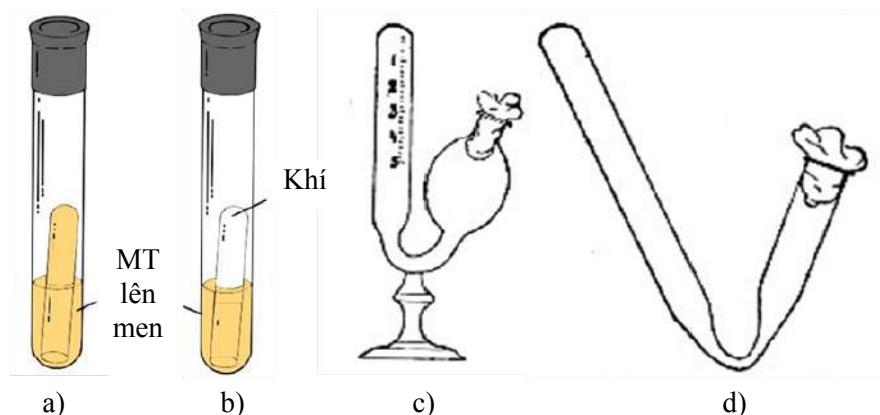
Đặt vào tủ ấm 30 °C trước đó 1 – 2 giờ (1 bình/nhóm).

d) Thí nghiệm và phân tích kết quả

Để nhận biết sự lên men rượu có diễn ra hay không, người ta dựa vào sự có mặt của rượu ethylic và CO₂ trong dịch lên men.

+ Đo thể tích khí CO₂:

Để đánh giá khả năng lên men rượu có thể xác định các sản phẩm hình thành như CO₂, acetaldehyde hoặc sản phẩm cuối cùng là ethanol. Trong đó cách đo thể tích CO₂ được hình thành là đơn giản hơn cả.



Hình 37. (a, b). Cách giữ khí CO₂ trong ống phao; (c, d). Bình lên men Smith.

Giữ khí CO₂ trong ống phao hoặc bình Smith (hình 37). Cây giống nấm men khoảng 10 ml đã hoạt hóa 24 giờ vào 90 ml môi trường Hansen dịch thể vô trùng rồi trộn đều, sau đó rót vào các ống nghiệm mỗi ống 10 ml và rót đầy vào các ống phao, cho ống phao vào ống nghiệm trên sao cho không có bọt khí trong ống phao, nút chặt miệng ống nghiệm rồi đặt vào tủ có nhiệt độ thích hợp. Khí CO₂ sinh ra sẽ đầy cột môi trường trong ống phao tụt xuống từ từ. Tính thể tích khí được hình thành trong một đơn vị thời gian.

Đối với bình Smith: Rót MT Hansen dịch thě có cây giống nấm men vào 2/3 bình Smith nút chặt miệng bình rồi đặt vào tủ có nhiệt độ thích hợp. Khí CO₂ sinh ra sẽ đầy cột môi trường trong ống Smith tụt xuống từ từ. Tính thě tích khí được hình thành trong một đơn vị thời gian.

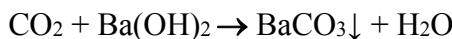
+ Phản ứng với Ba(OH)₂: Xác định sự có mặt của CO₂ trong dịch lên men.

Thí nghiệm

- Cho vào ống nghiệm 5 ml dịch lên men rượu.
- Thêm 1ml dung dịch Ba(OH)₂ 10%.
- Đun nóng nhẹ trên ngọn lửa đèn cồn. Để lắng.

Ông đối chứng: Làm tương tự như trên, song thay dịch lên men rượu bằng dịch chưa lên men. So sánh kết tủa ở hai ống thí nghiệm và đối chứng.

Kết quả: Nếu có mặt của CO₂ sẽ tạo thành kết tủa màu trắng do sự tạo thành BaCO₃ theo phản ứng:

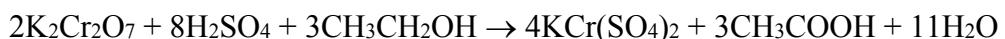


+ Phản ứng với K₂Cr₂O₇: Xác định sự có mặt của rượu trong dịch lên men.

Thí nghiệm:

- Cho vào ống nghiệm 2 ml dịch lên men rượu.
- Thêm 1 ml H₂SO₄ đậm đặc.
- Thêm vài tinh thě K₂Cr₂O₇ lắc đều cho đến khi xuất hiện màu xanh lục.

Kết quả: Dịch lên men có màu xanh lục, phương trình phản ứng diễn ra như sau:



Ông nghiệm đối chứng: Làm tương tự như trên, song thay dịch lên men bằng dịch chưa lên men. So sánh sự đổi màu ở hai ống thí nghiệm và đối chứng.

+ Quan sát nấm men: Làm tiêu bản từ dịch lên men rượu, nhuộm đơn bằng xanh methylene, rồi quan sát ở vật kính dầu ($\times 100$). Tế bào nấm men *S.cerevisiae* có hình cầu hay ovan, có một số đạng ở giai đoạn này chồi.

3.1.2. Lên men lactic

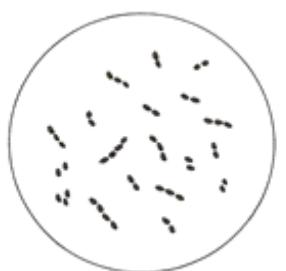
a) *Nguyên lý:* Khi phân giải đường trong điều kiện kỵ khí, vi khuẩn lactic chuyển H từ NADH sang acid pyruvic tạo thành acid lactic để tái tạo NAD⁺.



b) *Vi sinh vật:* Căn cứ vào sản phẩm sinh ra, quá trình lên men lactic được chia thành hai kiểu:

– Lên men lactic đồng hình sản phẩm chủ yếu là acid lactic (95 – 98%) gồm các chi: *Streptococcus* (*S. cremoris*, *S. lactis*, *S. thermophilus*) và *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. cucumerris*, *L. plantarum*...).

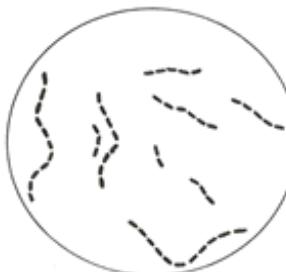
– Lên men lactic dị hình khi lên men các vi khuẩn chỉ tạo ra 60% acid lactic, phần còn lại là acid acetic, rượu ethylic, glycerol và một vài sản phẩm khác gồm các chi *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium* spp., *Leuconostoc mesenteroides*...).



Streptococcus lactis



Streptococcus cremoris



Lactobacillus plantarum



Lactobacillus bulgaricus

Hình 38. Vi khuẩn lactic.

c) Chuẩn bị trước dịch lên men lactic

- Nước dưa chua (nước dưa cải) 200 ml/nhóm, sữa chua 1 hộp/nhóm.
- Su hào, bắp cải hoặc rau cải đem rửa sạch, phơi héo, thái nhỏ, cho vào vại bỗ sung 10 – 15% đường kính, trộn đều với 6% muối ăn NaCl, rồi nén chặt. Cần phải để rau ngập chìm trong nước để dưa khỏi bị đen. Sau 2 – 4 ngày ở nhiệt độ 28 – 30 °C. Khi dưa bắt đầu chua là quá trình lên men lactic đã xảy ra.

d) Thí nghiệm và phân tích kết quả

* Phản ứng tạo thành acetaldehyde (định tính sự có mặt của acid lactic)

- *Nguyên tắc:* Dựa trên các phản ứng màu đặc trưng của acid lactic với một số hợp chất khác nhau để xác định sự có mặt của chúng trong quá trình lên men lactic.

– Thí nghiệm:

- + Cho 20 ml dịch lên men (nước dưa chua) vào cốc đong dung tích 100 ml.
- + Thêm 2ml H₂SO₄ 10%; thêm 5 ml KMnO₄ 5%.
- + Đậy cốc bằng tờ giấy lọc có tâm dung dịch AgNO₃ trong NH₄OH (10 g AgNO₃ cho nước cất đến 100 ml thêm từng giọt NH₄OH cho đến khi tan hết cặn, đựng dung dịch này trong lọ màu). Đặt cốc có đậy mảnh giấy lọc lên ngọn lửa đèn còn có lót một tấm lưới amiang và đun cho đến sôi. Quan sát sự chuyển màu của giấy lọc.

– Kết quả: Acid lactic chuyển sang dạng acetaldehyde (CH_3CHO) bay hơi gặp AgNO_3 làm đen giấy lọc.

* Phản ứng với thuốc thử thiophene:

Cách pha thuốc thử thiophene: Hòa 0,2 g thiophene vào 100 ml cồn 90°.

– Thí nghiệm:

+ Cho vào ống nghiệm 2 ml dịch nước dưa chua.

+ Thêm 5 ml H_2SO_4 đậm đặc; thêm 0,5 ml dung dịch CuSO_4 bão hòa.

+ Lắc đều rồi đun sôi trong nồi cách thủy trong 5 phút; lấy ra làm nguội dung dịch rồi thêm vài giọt thiophene 0,2% trong cồn.

– Kết quả: Nếu dịch có acid lactic sẽ xuất hiện màu đỏ mận.

Chú ý: Tất cả các thí nghiệm đổi chứng thay dịch lên men bằng dịch chưa lên men.

– Quan sát vi khuẩn lactic:

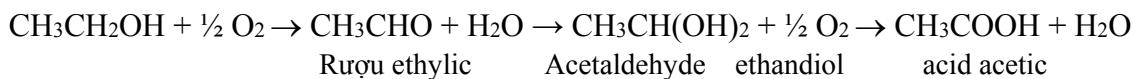
Làm tiêu bản vi khuẩn lactic trong nước dưa chua và trong sữa chua. Nhuộm đơn bằng xanh methylen, rồi quan sát ở vật kính dầu ($\times 100$).

* Chuẩn độ acid lactic:

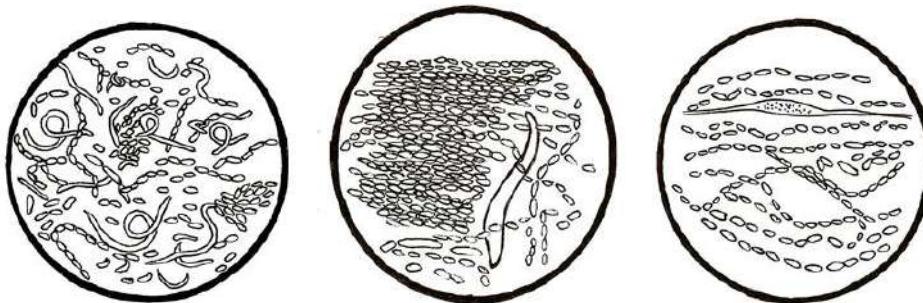
Lấy 10 ml dung dịch lên men lactic, thêm 20 ml nước cất, 1 – 2 giọt phenolphthalein (hòa tan 0,1 g chỉ thị phenolphthalein ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$)n trong 100 ml ethanol 96%). Sau đó chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 N. Tính khối lượng acid lactic có trong 10 ml dịch lên men bằng cách lấy số ml dung dịch NaOH 0,1 N đã dùng để chuẩn độ nhân với 0,009 (1 ml dung dịch NaOH 0,1 N tương ứng với 0,009 g acid lactic).

3.1.3. Lên men acetic (quá trình oxy hóa rượu ethylic thành dấm)

a) Nguyên lý: Lên men acetic thực chất là quá trình oxy hóa rượu ethylic thành dấm, theo phương trình phản ứng sau đây:



Các VSV tham gia vào quá trình này gồm nhiều loài chủ yếu là chi *Acetobacter* như *Acetobacter pasteurianum*, *A. aceti*, *A. xylinum*.



a – *Acetobacter pasteurianum*,

b – *A. aceti*

c – *A. xylinum*

Hình 39. Vi khuẩn acetic.

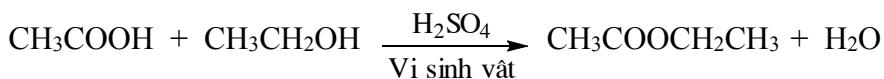
b) Chuẩn bị trước dịch “lên men” dâm

Cho vào bình nón dung tích 150 ml 30 – 40 ml bia, hoặc dung dịch gồm 10 – 15% rượu ethylic và 3 – 5% đường saccharose làm chất giàu năng lượng và acid hóa môi trường bằng 3 – 5 ml acid acetic 1 N đến pH 4,5 – 5,0. Đậy kín bằng nút bông và đặt vào tủ ám 30 °C. Sau 5 – 7 ngày trên bề mặt thoáng của bình sẽ xuất hiện váng màu trắng nhạt do các vi khuẩn acetic tạo thành.

c) Thí nghiệm và phân tích kết quả

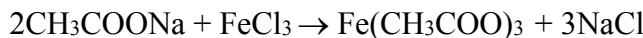
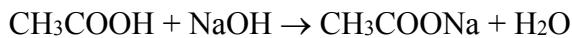
+ Phản ứng tạo ethylacetate (Định tính acid acetic):

Cho vào ống nghiệm 5 ml dung dịch “lên men” acetic, thêm 0,5 ml cồn 95% và 3 ml H₂SO₄ đậm đặc, trộn đều rồi đun nóng trên ngọn đèn cồn. Nếu dung dịch lên men có acid acetic sẽ có mùi thơm của ethylacetate (mùi dầu chuối). Phản ứng diễn ra như sau:



+ Phản ứng tạo thành sắt acetate:

Cho vào ống nghiệm 3 ml dung dịch lên men, thêm vào đó 1ml NH₄OH hay NaOH 20%, vài giọt dung dịch FeCl₃ 5%, lắc đều và đun nóng trên ngọn lửa đèn cồn. Nếu dung dịch có chứa sắt acid acetic thì sẽ tạo thành sắt acetate có màu đỏ thẫm, phản ứng xảy ra như sau:



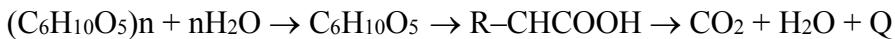
+ Phản ứng định lượng acid acetic:

Cho vào bình nón dung tích 100 ml 10 ml dung dịch lên men, thêm vào đó 1 – 2 giọt dung dịch phenolphthalein 0,1%. Sau đó chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1 N rồi tính ra số gam acid acetic trong 10 ml dung dịch lên men. Biết rằng 1 ml NaOH 0,1 N tương đương với 0,006 g acid acetic.

3.2. Sự phân giải cellulose

3.2.1. Sự phân giải cellulose hiếu khí

a) Nguyên tắc: Khi có O₂ cellulose bị một số VSV phân hủy thành CO₂ và H₂O.



b) Vì sinh vật phân giải cellulose hiếu khí gồm nấm mốc (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Trichoderma*..) vi khuẩn (*Bacillus*, *Cellvibrio*, *Cellfalicula*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*), xạ khuẩn (*Streptomyces*).

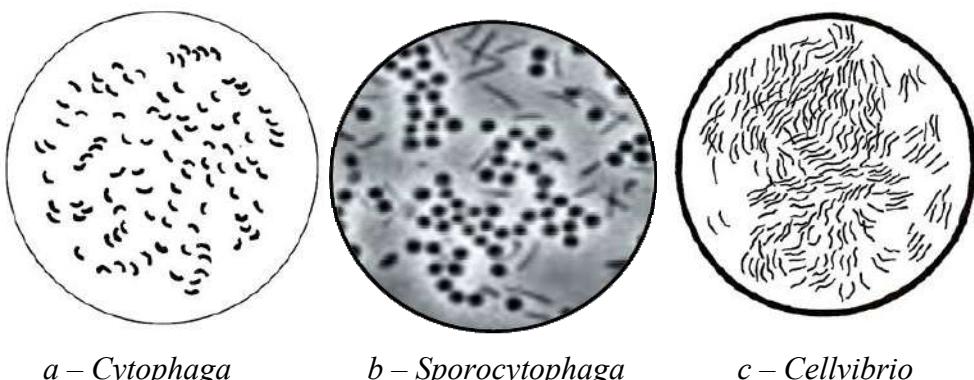
c) Thí nghiệm và phân tích kết quả:

– Chuẩn bị môi trường Huschinson (g/l): KH₂PO₄ – 1 g; CaCl₂ – 0,3 g; MgSO₄ – 0,3 g; NaCl – 0,1 g, FeCl₃.6H₂O – 0,01 g; NaNO₃ – 2,5 g; nước 1000 ml; pH: 7,0 – 7,3.

– Thí nghiệm: Rót MT Huschinson vào bình nón dung tích 150 ml (dày khoảng 2 cm), thêm 0,5 g đất và một mẫu phân (bằng hạt đậu xanh). Gấp và đặt một miếng giấy lọc sao cho một phần giấy lọc chìm trong MT, phần còn lại nằm trong không khí. Đậy nút bông lén miệng bình nón, đặt vào tủ âm 28 – 30 °C trong 10 – 15 ngày.

– Kết quả: Sự phân hủy giấy lọc sẽ xảy ra mạnh ở vùng tiếp xúc giữa không khí và môi trường. Có thể nhìn thấy khuẩn lạc VSV mọc tại vùng này.

– Quan sát vi khuẩn phân giải cellulose hiếu khí: Quan sát sự phân hủy của giấy lọc tại vùng có khuẩn lạc, làm tiêu bản cố định nhuộm đơn từ các khuẩn lạc mọc trên vùng giấy lọc và quan sát VSV ở vật kính ($\times 40$) và ($\times 100$).



Hình 40. Vi khuẩn phân giải cellulose hiếu khí.

3.2.2. Sự phân giải cellulose kỵ khí

a) Nguyên tắc: Trong điều kiện thiếu oxy, các VSV ưa âm hoặc ưa nóng sống phổ biến trong đất thuộc các chi *Clostridium*, *Bacillus* có khả năng phân giải kỵ khí cellulose.

b) Vi sinh vật phân giải cellulose kỵ khí thường gặp trong rác thải: *Clostridium Omelianskii*, *Bacillus cellulomonas*, *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fribisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Siphonobacter aquaeclarae*, *Cellulosimicrobium funkei*, *Ochrobactrum cytisi*, *Kaistia adipata*, *Desvosia riboflavia*, *Labrys neptuniae*...

c) Thí nghiệm và phân tích kết quả:

– Chuẩn bị môi trường Imsenietxki A theo TCVN 6168:2002, pH 7,0 – 7,4.

Cho vào ống nghiệm 10 ml MT có thành phần: KNH₄HPO₄ – 1,5 g; KH₂PO₄ – 0,5 g; NaCl₂ – 0,1 g; K₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄ – 0,4 g; peptone – 5 g; CaCO₃ – 2 g; dung dịch MnSO₄.5H₂O 1 % – 1 giọt; dung dịch FeSO₄.7H₂O 1 % – 1 giọt; nước – 1000 ml.

– Tiến hành: Cho một giải giấy lọc có kích thước 10 × 15 ngập sâu trong MT. Bổ sung vào đó 5 ml dịch đất ở độ pha loãng 10⁻², đun sôi nhẹ. Đặt vào tủ âm 30 °C sau 10 – 15 ngày.

– Kết quả: Sau thời gian nuôi cây vi khuẩn phân giải cellulose kỵ khí sẽ làm cho MT vẫn đặc và làm cho giải giấy lọc nát dần.

– Quan sát vi khuẩn phân giải cellulose ký khí: Quan sát sự phân hủy của giấy lọc, làm tiêu bản cố định nhuộm đơn từ dịch nuôi cây và quan sát VSV ở vật kính $\times 40$ và $\times 100$.



a – Té bào sinh dưỡng non

b – Té bào với bào tử

c – Bào tử

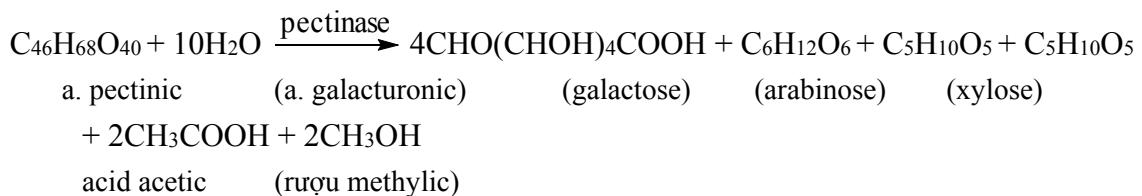
Hình 41. Vi khuẩn *Clostridium omelianskii* phân hủy cellulose ký khí.

3.2.3. Lên men butyric các chất pectin

a) *Nguyên lý*: Pectin là chất gian bào chứa nhiều trong các phế thải thực vật. Chúng bị phân hủy nhờ các enzyme pectinase. Khả năng phân giải pectin được ứng dụng trong xử lý phế thải nông nghiệp có nguồn gốc thực vật.

Enzyme pectinase của một số VSV phân giải pectin tạo ra đến 35% arabinose, 65% hydratepectin mà chủ yếu là pectinic. Quá trình lên men phân giải pectin gồm hai giai đoạn kế tiếp nhau:

– Giai đoạn 1: Pectin bị phân hủy bởi pectinase tạo thành đường 5,6 carbon, acid béo và rượu.



– Giai đoạn 2: Song song xảy ra hai loại phản ứng nhờ các enzyme của VSV: galactose và arabinose đều bị thủy phân để tạo thành hợp chất 4 carbon là acid butyric.



acid butyric



Phản ứng thủy phân mới được VSV sử dụng và oxy hóa chúng thành CO_2 và $2\text{H}_2\text{O}$. Còn trong điều kiện ký khí chúng lại phân giải thành acid butyric CO_2 và $2\text{H}_2\text{O}$.

Các VSV tham gia gồm:

– Vi sinh vật hiếu khí: *Bacillus subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Clos. polymyxa*, nấm mốc *Mucor stolonifera*.

– Vi sinh vật ký khí: *Clos. pectinovorum*, *Clos. Felsineum*.

b) Chuẩn bị trước dịch lên men pectin

– Cho vào ống nghiệm:

+ Một bó nhỏ vỏ đay hay gai tước thành sợi dài 5 – 6 cm, buộc chỉ hai đầu bó

+ Đổ nước cho ngập bô đay. Đun ống nghiệm trong nồi cách thủy sôi 3 phút rồi đổ nước trong ống nghiệm đi nhằm loại trừ một số chất có thể làm nguồn carbohydrate cho các vi khuẩn butyric. Cứ thay nước và đun như thế 5 – 6 lần. Lần cuối cùng đổ nước mới vào đầy đến 2/3 ống nghiệm. Đậy nút ống nghiệm và khử trùng 1 atm trong 30 phút.

+ Đợi nguội đến 50 – 60 °C cho vào mỗi ống 1ml dịch đất vườn đã gạn trong

+ Đặt vào tủ âm 35 – 37 °C trong 5 ngày.

– Quá trình lên men pectin xảy ra làm cho dịch ngâm bị đục dần, có bọt khí thoát ra và làm cho bó đay nổi lên.

– Sau 2 tuần, sự lên men pectin kết thúc bó đay lại chìm xuống. Trong điều kiện kỵ khí nhiều loại vi khuẩn có khả năng lên men pectin, mạnh mẽ nhất là *Plectridium*, *Clos. pectinovorum*, *Clos. felsineum*.



Hình 42. Vị khuẩn *Clostridium felsineum* phân giải pectin.

c) Phân tích kết quả thí nghiệm

– Phản ứng định tính butyrate:

Nguyên tắc: Dựa vào các phản ứng đặc trưng của acid butyric với các chất dễ phát hiện sự có mặt của chúng trong dịch lên men.

Thí nghiệm: Phản ứng tao thành sắt butyrate.

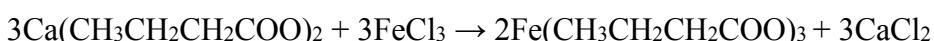
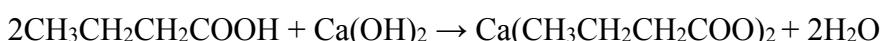
Cho vào ống nghiêm:

+ 5 ml dịch lên men pectin đã trung hòa 0,1 g Ca(OH)₂.

+ Thêm vào 2 ml FeCl_3 5%.

+ Đun nóng trên ngọn lửa đèn cồn.

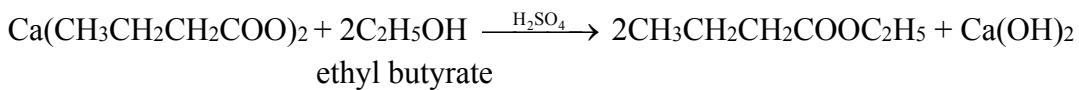
Kết quả: Dung dịch có màu đỏ nâu do sắt butyrate được tạo thành. Phản ứng diễn ra như sau:



– Phản ứng tạo thành ethyl butyrate:

Cho vào ống nghiệm 5 ml dung dịch lên men đã trung hòa bằng Ca(OH)₂, thêm vào đó 0,5 ml rượu ethylic 95% và 2 ml H₂SO₄ đậm đặc.

Kết quả: Đun nóng và lắc nhẹ, ta ngửi thấy có mùi thơm của este ethyl butyrate. Phản ứng xảy ra như sau.



3.3. Sự chuyển hóa các hợp chất hữu cơ chứa nitơ

3.3.1. Quá trình ammonium hóa

a) Quá trình ammonium hóa protein (Quá trình thối rữa)

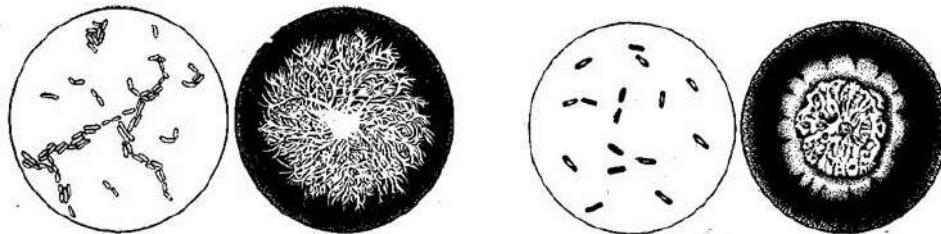
– Nguyên tắc: Quá trình ammonium hóa là sự tạo thành NH₃ từ các hợp chất nitơ hữu cơ (protein, urea, acid nucleic)... dưới tác động của vi sinh vật.

– Vi sinh vật: Rất nhiều loại VSV khác nhau tham gia vào quá trình này, đáng chú ý nhất là các loài sau đây:

+ Vi khuẩn: *Bac. mycoides*, *Bac. mesentericus*, *Bac. cereus*...

+ Xạ khuẩn: *Str. Griseus*, *Str. rimosus*, *Str. Fradiae*.

+ Nấm mốc: *Asp. oryzae*, *Asp. flavus*, *Asp. niger*, *Asp. Awamori*...



a – Tế bào và khuẩn lạc của *Bac. mycoides* b – Tế bào và khuẩn lạc của *Bac. mesentericus*

Hình 43. Vi sinh vật phân giải protein

Chuẩn bị dịch lên men thối

– Cho vào bình nón dung tích 250 ml 15 g thịt bò tươi, thêm 100 ml nước và 1 g đất. Đun sôi nhẹ (để giết các tế bào sinh dưỡng và giữ lại những tế bào mang bào tử). Đồng thời ở miệng bình kẹp 1 rải giấy quỳ đỏ để xác định sự có mặt của NH₃ và giấy lọc tẩm dung dịch chì acetate Pb(CH₃COO)₂ để xác định H₂S. Đặt vào tủ ấm 30 °C trong 4 – 7 ngày để VSV có bào tử phát triển và phân giải protein.

Phân tích kết quả thí nghiệm

– Phản ứng kết tủa của protein:

Cho vào ống nghiệm:

+ 5 ml dung dịch lên men thối.

+ Thêm 5 – 6 giọt acid acetic 5%. Đun sôi nhẹ ống nghiệm.

Kết quả: Có kết tủa trắng do protein bị kết tủa.

– Phản ứng màu của protein:

Cho vào ống nghiệm:

+ 5 ml dung dịch lên men thối.

+ Thêm 1ml dung dịch NaOH 30% và 0,5ml CuSO₄ 1%.

+ Đun nhẹ ống nghiệm cho sôi.

Kết quả: Dung dịch có màu xanh tím nếu trong đó có protein, hoặc màu hơi đỏ nếu trong đó có pepton.

– Xác định khả năng tạo thành NH₃:

Chọn một bình nón loại 250 ml:

+ 20 ml dịch lên men thối.

+ Đặt giấy quỳ đỏ tấm nước ở miệng bình nón, không cho giấy chạm vào dịch lên men, nút bông lại, dùng nilon bao bên ngoài cho kín phần miệng bình nón.

Kết quả: Có NH₃ bay ra thì giấy quỳ đỏ sẽ chuyển thành màu xanh.

– Quan sát vi khuẩn: Làm tiêu bản nhuộm đơn và quan sát VSV ammonium hóa protein: từ dịch lên men thối ở vật kính × 40 và × 100.

b) Quá trình ammonium hóa urea

Nguyên lý: Urea là thành phần chính của nước tiểu người động vật hay trong phân đậm urea tổng hợp. Hàm lượng nitơ trong urea có tới 47%. Tuy nhiên thực vật không có khả năng hấp thụ trực tiếp loại nitơ này, nếu nó chưa được VSV phân hủy thành NH₄⁺.

Quá trình phân giải này xảy ra như sau:



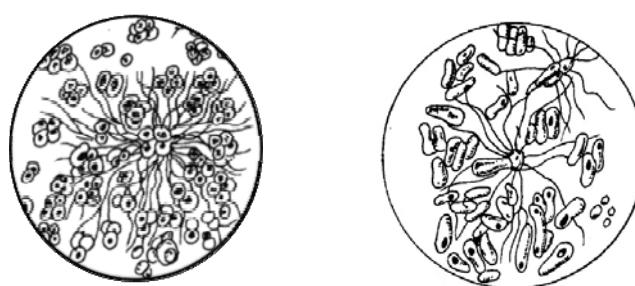
(NH₄)₂CO₃ không bền vững, do đó dễ dàng phân giải tiếp:



Vi khuẩn phân giải urea: Những loài đáng chú ý là:

+ Cầu khuẩn: *Planosarcina ureae*, *Micrococcus ureae*, *Sarcina hansenii*.

+ Trục khuẩn: *Urobacillus pasteurii*, *Bac. Amylovorum*.



a – *Planosarcina ureae*

b – *Urobacillus pasteurii*

Hình 44. Vi khuẩn phân giải urea.

– Chuẩn bị MT Kalitactrate chứa 5% urea: Kalitactrate –5 g; urea – 50 g; K₂HPO₄ – 0,5 g; nước 1000 ml.

– Lấy 30 ml MT trên cho vào bình nón dung tích 100 ml, đun sôi MT rồi để nguội. Thêm 1 g đất để cung cấp nguồn VSV. Đặt vào tủ ấm 30 °C từ 3 – 4 ngày.

– Làm tiêu bản và quan sát vi khuẩn ammonium hóa urea (*Urobacillus pasteurii* và *Planosarcina urea*) từ dịch nuôi kalitactrate chứa 5% urea trước 3 – 4 ngày.

– Xác định sự hình thành NH₃: cho vào ống nghiệm 5 ml dung dịch nuôi cây kalitactrate chứa 5% urea trước 3 – 4 ngày. Đặt giấy quỳ đỏ tấm nước ở miệng ống nghiệm, không cho giấy chạm vào dịch lên men, nút bông lại, dùng nilon bao bên ngoài cho kín phần miệng. Kết quả: có NH₃ bay ra thì giấy quỳ đỏ sẽ chuyển thành màu xanh.

3.3.2. Quá trình nitrate hóa

a) Chuẩn bị canh trường nuôi vi khuẩn nitrite và vi khuẩn nitrate

– Canh trường vi khuẩn nitrite

Cho vào ống nghiệm 5 ml MT Vinogradski-1. Đun sôi để nguội. Cho một ít đất vào (cho nguồn VSV). Nuôi cây 30 °C trong 5 – 7 ngày.

MT Vinogradski-1 (g/l): (NH₄)₂SO₄ – 2 g; K₂HPO₄.3H₂O – 1 g; MgSO₄.7H₂O – 0,5; NaCl – 2 g; FeSO₄.7H₂O – 0,1 g; CaCO₃ – 1 g; nước cất 1000 ml.

– Canh trường vi khuẩn nitrate:

Cho vào ống nghiệm 5 ml MT Vinogradski-2. Đun sôi để nguội. Cho một ít đất vào (cho nguồn VSV). Nuôi cây 30 °C trong 5 – 7 ngày.

MT Vinogradski-2 (g/l): NaNO₂ – 1 g; KH₂PO₄ – 0,5 g; MgSO₄.7H₂O – 0,3 g; Na₂CO₃ – 1 g; NaCl – 0,5 g; FeSO₄.7H₂O – 0,1 g; nước cất 1000 ml.

b) Thực hiện phản ứng để nhận biết quá trình nitrate hóa

– Giai đoạn nitrite hóa:

Xác định nitrite bằng một trong những cách sau:

+ Cho vào ống nghiệm 5 giọt thuốc thử hỗn hợp A.

+ Thêm 2 giọt dung dịch H₂SO₄ 10% và 2 giọt dịch nuôi cây vi khuẩn nitrite từ dịch nuôi Vinogradski-1.

Kết quả: Nếu có mặt nitrite, dịch nuôi cây sẽ xuất hiện màu lam.

– Giai đoạn nitrate hóa:

+ Cho vào bǎn sứ lõm 1 – 2 giọt dịch vi khuẩn nitrate hóa từ dịch nuôi của mô Vinogradski-2.

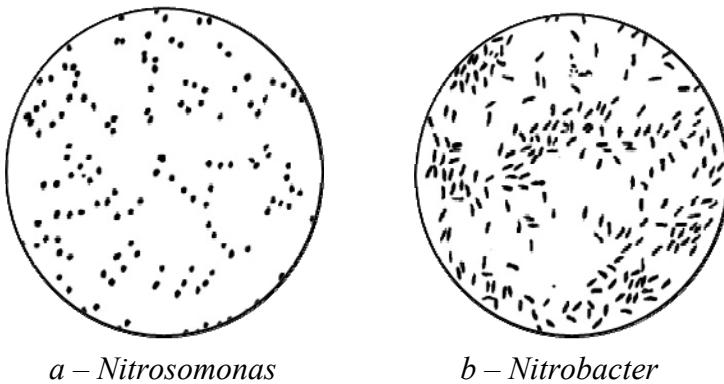
+ Thêm 1 – 2 giọt dung dịch diphenylamine.

Kết quả: Dung dịch có mặt NO₃ sẽ xuất hiện màu xanh.

Thuốc thử hỗn hợp A: Cân 2 g tinh bột, hòa vào một ít nước, sau đó vừa lắc vừa đổ vào 50 ml dung dịch ZnCl₂ 20% và tiếp tục đun sôi. Thêm 1 g ZnCl₂ và pha loãng đến 400 ml. Giữ thuốc thử trong lọ màu.

Thuốc thử diphenylamine: Diphenylamine 1 g, H₂SO₄ đậm đặc 100 ml, nước cát 20 ml. Hòa diphenylamine vào nước cát, thêm dần acid H₂SO₄ đậm đặc.

– *Quan sát vi khuẩn:* Làm tiêu bản nhuộm đơn vi khuẩn *Nitrosomonas* sp. từ dịch nuôi Vinogradski-1, vi khuẩn *Nitrobacter* từ dịch nuôi Vinogradski-2, quan sát ở vật kính ($\times 40$) và ($\times 100$).



Hình 45. Vi khuẩn nitrate hóa.

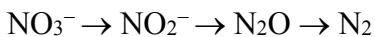
3.3.3. Quá trình phản nitrate hóa

a) Chuẩn bị canh trường nuôi vi khuẩn phản nitrate hóa

Cho vào ống nghiệm 15 ml MT nitrate – đường kính (NaNO₃ – 2 g; K₂HPO₄.3H₂O – 1 g; MgSO₄.7H₂O – 0,5 g; KCl – 0,5 g; FeSO₄.7H₂O – 0,01 g; đường kính – 30 g; nước máy – 1 lít). Dun sôi để nguội, cho 1 g đất vào. Để tạo MT kỵ khí có thể cho một lớp dầu vaseline lên bề mặt môi trường, nút bông lại, dùng nilon bao bên ngoài cho kín phần nút lại. Nuôi cây 30 – 35 °C trong 5 – 6 ngày.

b) Thực hiện phản ứng để nhận biết quá trình phản nitrate hóa

– Bản chất sinh hóa: Trong điều kiện kỵ khí một số VSV dùng nitrate làm chất nhận H₂, khử nitrate đến nitơ phân tử theo các bước sau:



Phương trình tổng quát như sau:



– Vi sinh vật tham gia: Quá trình phản nitrate hóa thường được thực hiện nhờ các Chi vi khuẩn như *Bacterium denitrificans*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Azospirillum*, *Thiobacillus*...

– Thực hiện phản ứng để nhận biết quá trình phản nitrate hóa:

+ Quan sát sự phát triển của vi khuẩn phản nitrate hóa bằng cách theo dõi sự xuất hiện các bọt khí (CO₂, N₂) ở ngày thứ 2 – 4.

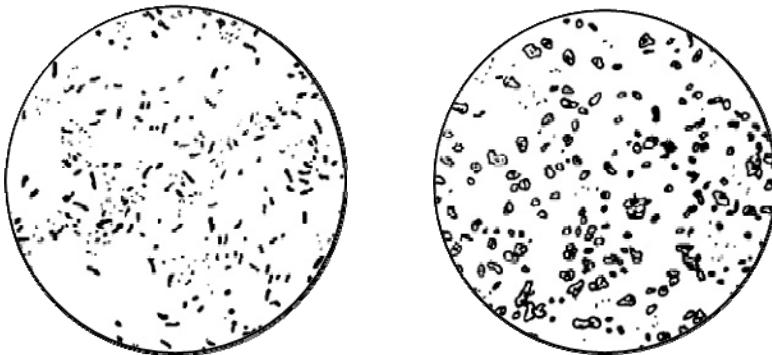
+ Kiểm tra sự tạo thành NO_2^- và NH_3 :

• Kiểm tra xem dung dịch có tạo thành NO_2^- hay NO_3^- không bằng thuốc thử Griss, có khử hết hay không bằng thuốc thử diphenylalanine (xem phần nitrate hóa).

• Kiểm tra sự tạo thành NH_3 bằng cách đặt giấy quỳ đỏ, giấy tẩm dung dịch Nessler lên miệng nút bông ống nghiệm.

Chú ý: Các thí nghiệm đối chứng tiến hành bằng nước cát thay cho dịch lên men.

c) Quan sát vi khuẩn: Làm tiêu bản nhuộm đơn, quan sát vi khuẩn phân nitrate hóa từ dịch nuôi nitrate – đường kính (sau 5 – 6 ngày) ở vật kính ($\times 40$) và ($\times 100$).



a – *Bacterium denitrificans*

b – *Achromobacter stutzeri*

Hình 46. Vi khuẩn phân nitrate hóa.

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. Nêu bản chất hóa học và sinh học của quá trình lên men rượu?
2. Giải thích thí nghiệm định tính acid lactic trong dịch lên men lactic?
3. Nêu các bước xác định sự có mặt của acid acetic trong dịch “lên men” acetic?
4. Giải thích thí nghiệm phân giải cellulose trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí.
5. Nêu các bước xác định sự có mặt của acid butyric trong dịch lên men pectin?
6. Bản chất hóa học và sinh học của quá trình ammonium hóa protein và ammonium hóa urea?
7. Bản chất hóa học và sinh học của quá trình nitrate hóa? Ý nghĩa thực tiễn của quá trình phân nitrate hóa? Phân biệt vi khuẩn *Nitrosomonas* và vi khuẩn *Nitrrobacter*?

BÀI 7. VI KHUẨN CÓ ĐỊNH NITO – SẢN XUẤT VÀ SỬ DỤNG NITRAGIN

I. NGUYÊN LÝ

Có định nitơ – đó là khả năng đồng hóa nitơ phân tử của một số vi sinh vật có enzyme nitrogenase và dùng N₂ này để cấu tạo nên tất cả các hợp chất chứa nitơ của tế bào. Khả năng này có ở nhiều VSV sống tự do trong đất và trong nước: các loài thuộc các chi: *Azotobacter*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aerobacter*, vi khuẩn dinh dưỡng quang năng, vi khuẩn sinh methane, vi khuẩn khử sulfate, vi khuẩn lam... Ngoài ra, khả năng cố định nitơ còn có ở vi khuẩn nốt sàn chi *Rhizobium* sống cộng sinh trong rễ cây họ đậu, chi *Frankia* – xạ khuẩn sống cộng sinh trong nốt sàn cây phi lao... Có ý nghĩa quan trọng nhất đối với việc làm giàu nitơ cho đất là vi khuẩn nốt sàn và các loài trong chi *Azotobacter* và *Clostridium*.

Phương thức chế tạo chế phẩm nitragin hay azotobacterin đơn giản nhất là nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường thạch, trong những ống thạch nghiêng – nhân giống và lên men trong môi trường dịch thể – tẩm nhiễm vào chất mang vi khuẩn cần đảm bảo có chứa $\geq 10^9$ CFU/g. Khi sử dụng hòa loãng chế phẩm với nước – tẩm nhiễm vào hạt giống trước khi gieo hoặc tưới vào đất trước khi gieo hạt giống.

II. THỰC HÀNH

1. Mục tiêu

- Hiểu được vai trò của VSV trong quá trình cố định nitơ.
 - Nắm được bản chất sinh học và hóa học của các quá trình cố định nitơ.
 - Biết cách thu nhận vi khuẩn cố định đạm sống tự do: *Azotobacter* và *Clostridium*.
 - Nắm được phương pháp sản xuất và sử dụng chế phẩm nitragin.

2. Mẫu vật hóa chất và dụng cụ

2.1. Mẫu vật

- Nốt sần cây ho đậu (5 gốc cây ho đậu có nốt sần).

2.2. hóa chất và dung cu (theo từng thí nghiệm)

3. Các bước tiến hành

3.1. Vi khuẩn cố định nitơ sống tự do: *Azotobacter* và *Clostridium*

a) Chuẩn bị môi trường Ashby thu nhận *Azotobacter* và *Clostridium*

* Môi trường Ashby lỏng (g/l):

Glucose 20 g K₂HPO₄.3H₂O 0,2 g

MgSO₄.7H₂O 0,2 g
K₂SO₄ 0,1 g
Nước cất 1000 ml

NaCl 0,2 g
CaCO₃ 5 g

* Nếu pha chế môi trường Ashby đặc thêm 20 g thạch (agar)/1000 ml.

b) Xác định sự hiện diện của Azotobacter và Clostridium

Tiến hành: Rót 150 ml môi trường Ashby dịch thể (không có thạch) vào bình nón dung tích 250 ml. Đun sôi để nguội thêm 1 g đất trồng trọt. Đặt vào tủ ấm 28 – 30 °C từ 5 – 7 ngày.

Kết quả: Trên bề mặt môi trường hình thành màng của Azotobacter có màu nâu. Dịch trong bình nổi bọt và bốc mùi acid butyric chứng tỏ sự có mặt của *Clostridium pasteurianum*.

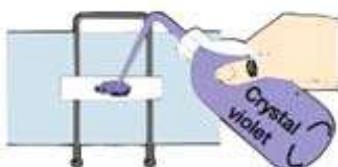
Tiến hành: Cho vào ống nghiệm 5 ml dung dịch nuôi cấy; thêm 2 ml dung dịch FeCl₃ 10% và đun sôi.

Kết quả: Dung dịch trong ống nghiệm có màu đỏ tươi, chứng tỏ có butyrate sắt được tạo thành.

** Quan sát hình thái Azotobacter và Clostridium*

– Làm tiêu bản âm từ màng bề mặt môi trường để quan sát vi khuẩn *Azotobacter*. Hai tế bào gắn với nhau giống như hạt coffee.

– Làm tiêu bản nhuộm đơn bằng thuốc nhuộm Lugol hay tím gentian để quan sát vi khuẩn *Clostridium pasteurianum*. Do bào tử của vi khuẩn này có đường kính lớn hơn đường kính của tế bào lại nằm ở một đầu nên làm cho tế bào có dạng dùi trống.



a) Nhỏ lên vết bôi 1–2 giọt crystal violet để 4 – 7 phút



b) Rửa sạch tiêu bản bằng dung dịch CuSO₄ 20%



c) Thấm khô bằng giấy thấm



d) Vi khuẩn có vỏ nhầy

Hình 47. Các bước nhuộm màng nhầy.
(Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002).

c) Quan sát màng nhầy (hay vỏ nhầy)

- Mẫu dịch nuôi Azotobacter hay vi khuẩn nghi ngờ có màng nhầy.
- Làm tiêu bản cố định.
- Tiến hành nhuộm vỏ nhầy theo các bước a, b, c hình 47 (theo Prescot et al, 2002).

Kết quả: (d) vi khuẩn có màng nhầy.

* Phương pháp làm tiêu bản âm nền đen bằng mực nho từ dịch đất trồng

Nguyên tắc: Mực nho không thâm vào Azotobacter tạo một khoảng trống, trắng chung quanh tế bào.

Cách tiến hành:

- Nhỏ một giọt mực nho đặc lên lam kính.
- Hòa một vòng que cây dầu tròn dịch đất trồng đã pha loãng (1 g đất pha loãng trong 5 ml nước) vào giọt mực nho rồi trộn đều.
- Đậy lamen và quan sát tiêu bản với vật kính ($\times 40$).

Kết quả: Vỏ nhầy trong suốt trên nền đen của thị trường kính hiển vi.

d) Phân lập Azotobacter bằng cách cây các cục đất

* Chế MT Ashby thạch đĩa:

Rót MT Ashby đặc đang nóng chảy $45 - 50^{\circ}\text{C}$ vào các đĩa Petri, đặt lên mặt mỗi đĩa thạch từ 2 – 3 cục đất nhỏ (bằng hạt đậu) sao cho chúng tách biệt nhau. Án nhẹ cho cục đất chìm vào thạch. Đặt vào tủ ấm $28 - 30^{\circ}\text{C}$ từ 5 – 7 ngày. Xung quanh những cục đất nhỏ có những khuẩn lạc nhầy của *Azotobacter* phát triển.

* Cây Azotobacter từ khuẩn lạc:

Dùng que cây vô trùng dí vào khuẩn lạc nhầy quanh cục đất rồi cây truyền sang ống môi trường Ashby thạch nghiêng, đặt vào tủ ấm 5 – 7 ngày ở nhiệt độ $28 - 30^{\circ}\text{C}$. Sau đó chọn ra các ống có chủng *Azotobacter* thuần khiết.

3.2. Vi khuẩn cố định nitơ sống cộng sinh

3.2.1. Vi khuẩn lam cộng sinh với bèo hoa dâu

Vi khuẩn lam (*Cyanobacteria*) có khả năng cố định N_2 khi sống tự do trong đất hoặc cộng sinh với cây bèo hoa dâu. Hàng năm chúng có thể cố định được $30 - 50 \text{ kg nitơ/ha}$. Các chi vi khuẩn lam có khả năng cố định N_2 cao là *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Plectonema*, *Nostos*. Đặc biệt đáng chú ý là *Anabaena azolae* cộng sinh trong cây bèo hoa dâu.

+ Quan sát *Anabaena azolae*:

Lấy một cánh bèo hoa dâu dùng kim mũi mác đầm nát trên phiến kính, đậy lamen quan sát ở hệ kính khô ($\times 40$). *Anabaena azolae* có hình chuỗi hạt dài, trong chuỗi có thể thấy được các tế bào dị hình (bào tử nghỉ) có kích thước to hơn các tế bào khác.

3.2.2. Vi khuẩn nốt sần

Rhizobium là một chi vi khuẩn Gram âm sống trong đất có vai trò cố định đạm. *Rhizobium* hình thành một nhóm vi khuẩn cộng sinh cố định đạm sống trong rễ của các cây họ Đậu. Vi khuẩn này xâm chiếm tế bào rễ của cây tạo thành các nốt sần; ở đây chúng biến đổi nitơ trong khí quyển thành ammoniac và sau đó cung cấp các hợp chất nitơ hữu cơ cho cây. Còn cây thì cung cấp carbohydrate cho vi khuẩn từ quá trình quang hợp.



Hình 48. Vi khuẩn lam.

Những vi khuẩn nốt sần sống cộng sinh với cây họ Đậu. Chúng có khả năng cố định nitơ không khí. Những vi khuẩn này thuộc chi *Rhizobium*. Hình dạng và kích thước của vi khuẩn nốt sần thay đổi phụ thuộc vào những giai đoạn phát triển của chúng. Khi nghiên cứu nốt sần làm tiêu bản quan sát ở vật kính ($\times 40$), chúng có dạng hình cầu, hình que ngắn chuyển động. Trong canh trường nuôi cây cũ thì chúng bị biến dạng tạo thành các tế bào hình chữ X, Y, Z (giai đoạn già khuẩn thể). Giai đoạn già khuẩn thể thường trùng hợp với thời gian nở hoa của cây họ Đậu là giai đoạn cố định nitơ mạnh nhất.

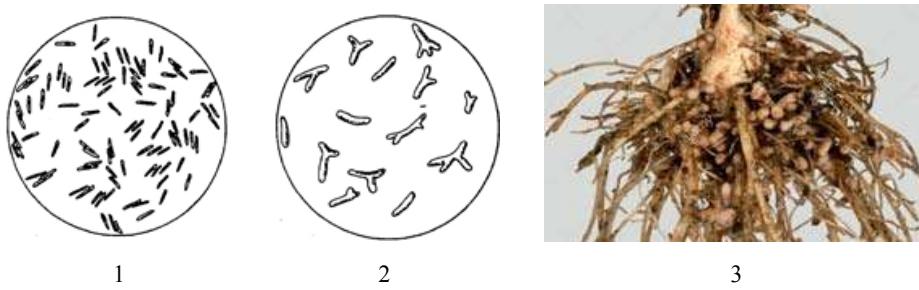
a) Phân biệt nốt sần vô hiệu và nốt sần hữu hiệu

Quan sát hình dạng, màu sắc, kích thước, vị trí của các nốt sần cây trên rễ cây đậu tương hoặc đậu lạc.

b) Quan sát vi khuẩn nốt sần *Rhizobium*

– Cắt 2 – 3 nốt sần to bỏ vào đĩa Petri đã có sẵn cồn 96% ngâm trong 5 phút rồi rửa sạch bằng nước cất. Dùng kẹp vô trùng chuyển những nốt sần sang đĩa Petri khác, ép nốt sần để lấy dịch ép, thêm 1 – 2 ml nước cất ta thu được dịch chứa vi khuẩn *Rhizobium*.

– Làm tiêu bản nhuộm đơn bằng dung dịch fuchsin loãng (1:1000). Từ dịch ép nốt sần và quan sát vi khuẩn này với vật kính ($\times 40$).



Hình 49. Các vi khuẩn nốt sần.

1. Các vi khuẩn từ nốt sần còn non; 2. Các giả khuẩn thể từ nốt sần già; 3. Nốt sần trên rễ cây họ đậu.

3.3. Sản xuất nitrugin

Hàng năm vi khuẩn nốt sần cộng sinh trong rễ các cây thuộc họ Đậu (*Leguminosales*) có thể làm giàu thêm cho đất khoảng 50 – 600 kg nitơ/ha, trung bình là 75 – 200 kg nitơ/ha.

Để nâng cao hiệu suất cố định nitơ của cây họ Đậu, từ lâu người ta đã nghĩ đến biện pháp chủ động nhiễm cho hạt giống các cây thuộc họ đậu những nòi vi khuẩn nốt sần hữu hiệu đã được lựa chọn. Vì vi khuẩn nốt sần có tác dụng đặc hiệu trên từng loài đậu nên nitrugin được sản xuất riêng cho từng loài đậu.

* Quy trình sản xuất nitrugin:

Nitrugin là loại phân vi sinh được chế tạo bởi vi khuẩn *Rhizobium* do Beijerinck phân lập năm 1888 và được Fred đặt tên vào năm 1889 dùng để bón cho các loại cây thích hợp của họ Đậu.

a) Phân lập vi khuẩn nốt sần

* Chuẩn bị môi trường phân lập *Rhizobium*:

Chế môi trường thạch đĩa có thành phần (g/l): Nước chiết giá đậu – 1000 ml (200 g giá đậu xanh đun sôi lọc lấy dịch trong); saccharose – 10 g; K₂HPO₄.3H₂O – 1 g; MgSO₄.7H₂O – 0,5 g; thạch – 20 g. Bổ sung thêm vào môi trường 1 ml dung dịch Crystal violet 1% (cân chính xác 1g Crystal violet, nghiền nhão hòa vào 1° ml còn 95%, thêm nước cất cho đến 100 ml).

* Chuẩn bị dịch nốt sần:

Chọn 2 – 3 nốt sần to màu hồng ở rễ chính bỏ vào cốc đã có sẵn cồn 96% ngâm trong 5 phút rồi rửa sạch bằng nước cất. Dùng kẹp vô trùng chuyển những nốt sần sang đĩa Petri khác, ép nốt sần để lấy dịch ép, thêm 1 – 2 ml nước cất ta thu được dịch chứa vi khuẩn *Rhizobium*.

* Tiến hành phân lập vi khuẩn nốt sần:

– Pha loãng dịch chứa vi khuẩn nốt sần từ 10⁻¹ đến 10⁻¹⁰.

– Dùng pipette vô trùng nhỏ 1 giọt dịch pha loãng 10⁻⁹, 10⁻¹⁰ lên từng đĩa thạch chứa môi trường nước chiết giá đậu trên. Dùng que gạt thủy tinh dàn đều giọt dịch ép ra khắp mặt thạch, sau đó đặt vào tủ ấm 28 – 30 °C, sau 4 – 5 ngày xuất hiện các khuẩn lạc. Từ những khuẩn lạc đã phát triển ta cấy sang những ống thạch nghiêng có thành phần như trên để thu được những dòng vi khuẩn nốt sần thuần khiết.

b) Tạo chế phẩm nitrugin

* Dạng thạch nghiêng:

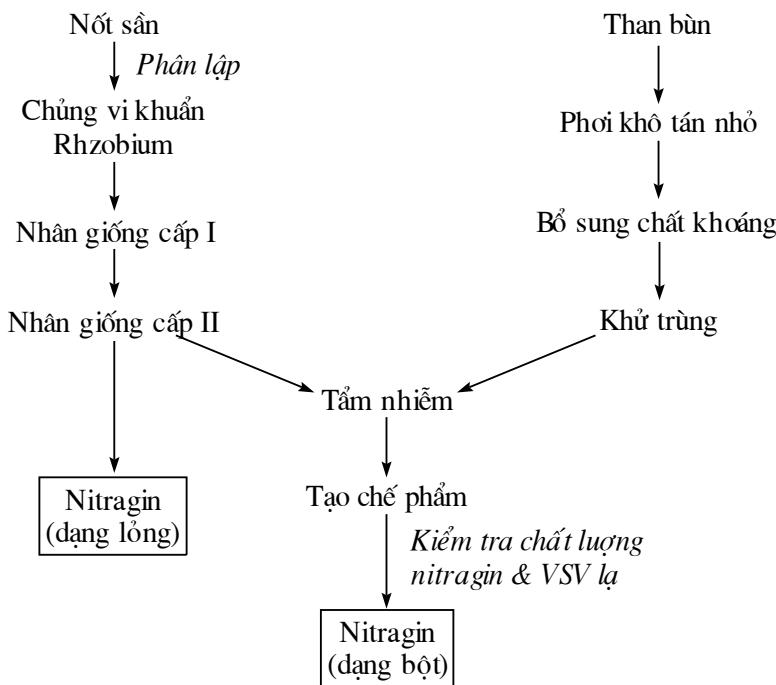
– Cây chuyền vi khuẩn *Rhizobium* trên MT (g/l): Glucose – 10; K₂HPO₄. 3H₂O – 0,5; MgSO₄. 7H₂O – 0,2; NaCl – 0,1; dịch chiết nấm men – 0,4; thạch – 20; nước – 1 lít; pH 7.

* Dạng dịch thê:

Nhân giống vi khuẩn *Rhizobium* bằng nuôi trên máy lắc (200 – 220 vòng/ phút) ở nhiệt độ 30 °C liên tục trong 72 giờ với MT dịch thê (g/l): Glucose – 10 g; K₂HPO₄. 3H₂O – 0,5 g; MgSO₄. 7H₂O – 0,2 g; NaCl – 0,1 g; dịch chiết giá đậu xanh (100 g giá đậu xanh – đun sôi 5 – 10 phút, lọc lấy nước trong) – 1 lít; pH 7.

* Dạng bột:

- Than bùn (chất mang) phoi khô tán nhở, thêm 1% đường saccharose và làm ẩm đến 40 – 60% rồi cho vào các chai hay túi nilon. Khử trùng ở 1,1 atm/30 phút. (chuẩn bị trước 8 bình nón loại 250 ml).
- Tạo chế phẩm nitragin dạng dịch thê trước 72 giờ.
- Thâm VK dịch thê đã nhân giống sau 72 giờ vào chất mang là than bùn sao cho trong 1 g than bùn có không dưới 70 triệu vi khuẩn.



Hình 50. Quy trình sản xuất nitragin.

c) Xác định chất lượng nitragin

Chất lượng nitragin được xác định bằng số lượng vi khuẩn nốt sần và số lượng vi khuẩn lạ có trong một đơn vị trọng lượng nitragin.

* Xác định số lượng vi khuẩn nốt sần trong 1 g nitragin thành phẩm:

- Chuẩn bị MT thạch đĩa nước chiết giá đậu xanh.
- Cân 1 g Nitragin thành phẩm pha loãng từ 10^{-1} – 10^{-8} .
- Lấy 1 ml từ độ pha loãng 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} cây sang các đĩa Petri mỗi độ pha loãng gieo cây 3 đĩa. Đặt vào tủ ấm 28 – 30 °C từ 2 – 3 ngày. Sau đó đếm số lượng CFU phát

triển trên mỗi đĩa Petri. Từ số lượng CFU trung bình trên mỗi đĩa thạch ta tính được số lượng vi khuẩn nốt sần/g nitragin (xem bài 4 mục 3.4: *đếm số lượng té bào sống*).

Ví dụ: Khi cấy 0,1 ml dịch nitragin ở độ pha loãng 10^{-6} , ta đếm được 40 CFU/1 đĩa thạch. Nếu biết rằng trọng lượng khô của 1 g nitragin là 0,95.

Số lượng vi khuẩn nốt sần/g được tính:

$$N = 10 \times 40 \times 10^6 : 0,95 = 42,1 \cdot 10^7$$

* Xác định số lượng vi sinh vật lạ trong nitragin:

Nitragin không được chứa nấm mốc, nấm men và xạ khuẩn. Số lượng vi khuẩn lạ không được vượt quá 8% số lượng vi khuẩn nốt sần.

Xác định số lượng VSV lạ trong nitragin được thực hiện song song với sự xác định số lượng vi khuẩn nốt sần.

– Chuẩn bị môi trường thạch – nước thịt – peptone ở dạng thạch đĩa.

– Cân 1 g Nitragin pha loãng từ $10^{-1} - 10^{-8}$.

– Lấy 1ml từ độ pha loãng $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$ cấy sang các đĩa Petri đựng MT thạch – nước thịt – peptone mỗi độ pha loãng gieo cấy 3 đĩa. Đặt vào tủ ấm $28 - 30^{\circ}\text{C}$ từ 3 – 4 ngày. Sau đó đếm số lượng vi sinh vật lạ trên mỗi đĩa Petri. Từ đó tính ra số lượng vi sinh vật lạ/g nitragin (xem bài 4 mục 3.4: *đếm số lượng té bào sống*). Kết quả thu được cho phép kết luận về chất lượng của nitragin.

d) *Cách sử dụng nitragin*

– Tẩm nitragin vào hạt trước khi gieo;

– Bón ché phẩm vào đất *trước* khi gieo hạt;

– Bón ché phẩm vào đất *sau* khi gieo hạt;

– Khi hạt nảy mầm và hình thành rễ, hòa ché phẩm vào nước rồi tưới lên bề mặt luống.

e) *Khi sử dụng nitragin cần lưu ý*

– Tính đặc hiệu đối với loài cây họ Đậu, tránh ánh sáng mặt trời chiếu trực tiếp.

– Tránh sử dụng đồng thời các loại thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ.

* *Mỗi sinh viên cần tiến hành*

– Làm ba tiêu bản quan sát và nhận biết các loại vi khuẩn cố định đạm: *Azotobacter*; *Clostridium* và *Rhizobium*.

– Phân biệt nốt sần hữu hiệu và nốt sần vô hiệu.

– Sản xuất thử ché phẩm nitragin: dạng thạch nghiêng, dạng dịch thể và dạng bột.

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. Bản chất sinh hóa và sinh học của quá trình cố định nitơ phân tử?
2. Các bước phân lập vi khuẩn *Azotobacter* từ đất trồng lúa?
3. Nguyên tắc và các bước tiến hành làm tiêu bản âm nền đen bằng mực nho từ dịch đất trồng?
4. Nêu các bước phân lập vi khuẩn *Rhizobium* từ nốt sần rễ cây họ đậu?
5. Trình bày tóm tắt cách chế tạo chế phẩm nitragin dạng bột. Các thao tác kiểm tra chất lượng chế phẩm nitragin?
6. Khi sử dụng chế phẩm nitragin cần lưu ý những điểm gì? Vì sao?

BÀI 8. XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH ENZYME VÀ CHẤT KHÁNG SINH CỦA VI SINH VẬT

I. NGUYÊN LÝ

1. Hoạt tính enzyme của vi sinh vật

Enzyme là những protein đặc hiệu có cấu tạo phức tạp, đóng vai trò xúc tác cho các phản ứng sinh hóa xảy ra nhanh chóng không cần đến sự hỗ trợ của nhiệt độ hay áp suất cao như các chất xúc tác hóa học.

Có nhiều phương pháp xác định enzyme, trong điều kiện cho phép, chúng tôi giới thiệu phương pháp thông dụng và đơn giản để xác định khả năng tạo thành các enzyme ngoại bào như protease, cellulase, amylase của vi sinh vật, đó là kiểm tra sự tạo thành enzyme bằng cách cây chấm điểm trên môi trường thạch. Đối tượng để kiểm tra là các vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm mốc trong tự nhiên.

2. Hoạt tính kháng sinh của vi sinh vật

Nhiều loại VSV như xạ khuẩn, nấm mốc, vi khuẩn trong hoạt động sống tạo ra các chất hóa học đặc hiệu, ức chế hoặc tiêu diệt sự sống của các loại VSV khác một cách có chọn lọc ngay ở nồng độ thấp (các chất kháng sinh) – chúng được gọi là các VSV sinh kháng sinh.

Hoạt tính kháng sinh của VSV là đặc tính cho thấy khả năng kìm hãm hay tiêu diệt một cách chọn lọc các chủng VSV kiểm định. Xác định hoạt tính kháng sinh thường bằng phương pháp thỏi thạch hay phương pháp đục lỗ.

II. THỰC HÀNH

1. Mục đích yêu cầu

- Biết cách xác định hoạt tính enzyme amylase, protease và cellulase.
- Biết cách đặt thí nghiệm xác định khả năng hình thành và hoạt tính các chất kháng sinh của VSV.

2. Dụng cụ, mẫu vật và hóa chất

2.1. Dụng cụ

Giá và ống nghiệm – 3 giá (10 ống/giá). Kẹp gỗ – 7 cái; đèn cồn – 3 cái; pipette cầm tay các loại: 1 ml, 5 ml mỗi loại 2 cái; khoan đồng – 2 cái.

Kính hiển vi có vật kính dùng dầu – 7 cái/nhóm; lam kính – 1 hộp; lamen – 1 hộp; giấy thấm – 1 hộp; khăn lau 2 cái; bật lửa – 1 cái; que cây dầu tròn – 4 que.

Hộp Petri: 40 hộp; pipette các loại 1 ml, 2 ml mỗi loại 2 cái.

2.2. Pha chế một số môi trường dinh dưỡng

- 1) Chuẩn bị môi trường thạch dĩa (nuôi cây VSV để xác định hoạt tính enzyme):
 - Chế môi trường Czapek – Dox (nuôi nấm mốc), (*xem thực hành bài 2: pha chế môi trường dinh dưỡng*).
 - Chế môi trường thạch – thịt – peptone (nuôi cây vi khuẩn), (*xem thực hành bài 2*).
- 2) Chế MT kiểm tra khả năng hình thành enzyme g/l: MT-1 amylase, MT-2 cellulase, MT-3 protease.

Môi trường 1 có thành phần: tinh bột tan – 10 g; NaNO₃ – 3 g; K₂HPO₄.3H₂O – 1 g; KCl – 0,5 g; MgSO₄.7H₂O – 0,5 g; FeSO₄.7H₂O – 0,01 g; thạch – 20 g; nước cất – 1000 ml; pH 7,0.

Môi trường 2 có thành phần: CMC – 10 g; NaNO₃ – 3 g; K₂HPO₄.3H₂O – 1 g; KCl – 0,5 g; MgSO₄.7H₂O – 0,5 g; FeSO₄.7H₂O – 0,01 g; thạch – 20 g; nước cất – 1000 ml; pH 7,0.

Môi trường 3 có thành phần: Saccharose – 30 g; Gelatine (hay sữa hộp) – 10 g; K₂HPO₄.3H₂O – 1 g; KCl – 0,5 g; MgSO₄.7H₂O – 0,5 g; FeSO₄.7H₂O – 0,01 g; thạch – 20 g; nước cất – 1000 ml; pH 7,0.

3) Chuẩn bị thuốc thử: dung dịch lugol – 200 ml; dung dịch (NH₄)₂SO₄ bão hòa trong nước – 200 ml.

4) Vi sinh vật kiểm định: Vi khuẩn *Bacillus subtilis*, nấm mốc *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. (mỗi loại 2 – 3 ống dạng thạch nghiêng đã nuôi cây VSV trước 72 giờ).

2.3. Khoanh giấy kháng sinh

– Các khoanh giấy kháng sinh được bảo quản trong hộp riêng. Giấy dự trữ phải để ở nhiệt độ –20 °C. Các khoanh giấy làm hàng ngày được giữ ở 2 – 8 °C tùy theo từng chỉ dẫn của hãng sản xuất. Trước khi sử dụng đặt ở nhiệt độ phòng 30 phút.

– Có thể tự làm bằng cách dùng giấy thấm tắm dịch kháng sinh rồi sấy khô ở nhiệt độ thấp (40 – 45 °C). Sau đó cắt thành từng khoanh hình tròn có đường kính 1 cm (tắm các loại kháng sinh penicillin, streptomycin, tetracyclin, griseofunvin 10 µg/khoanh).

2.4. Hóa chất – Pha hỗn hợp dung môi và dung dịch đệm

1) Pha hỗn hợp dung môi:

- n-Butanol: acetic acid: nước (4:1: 5).
- Methanol: acetic acid: nước (16: 1: 3).
- Chloroform: methanol: (NH₄)SO₄ 17% (2:1:1).

2) Pha dung dịch đệm PBS (phosphate Buffered Saline):

- NaCl – 8 g, KCl – 0,2 g, Na₂HPO₄.2H₂O – 1,44 g, nước cất vừa đủ 1000 ml.
- Lắc đều, điều chỉnh pH 7,4. Hấp ướt 120 °C/30 phút.

3. Các bước tiến hành

3.1. Xác định hoạt tính enzyme của vi sinh vật

3.1.1. Nguyên tắc

Chủng VSV vừa phân lập được nuôi cấy trên môi trường thích hợp để chúng tạo ra enzyme. Các enzyme do VSV tạo ra sẽ khuếch tán ra xung quanh dưới dạng vòng trong suốt quanh khuẩn lạc gọi là vòng thủy phân. Dùng thuốc thử đặc hiệu để phân biệt vùng cơ chất đã thủy phân với vùng cơ chất chưa được thủy phân, cẩn cứ vào đường kính vòng thủy phân và đường kính khuẩn lạc để xác định hoạt tính enzyme của chủng vi sinh vật đó.

3.1.2. Tiến hành thí nghiệm

Để nuôi cấy nấm mốc *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. lên MT Czapek – Dox (chỉnh môi trường có pH 5,5 hay xạ khuẩn *Streptomyces* sp. (pH 6,8 – 7,2) và khử trùng môi trường 121 °C/30 phút, sau đó đổ MT vào các đĩa Petri, khi thạch đã đông dùng que cấy mộc cấy các chủng nấm mốc, xạ khuẩn vào ba loại MT nói trên (MT-1, MT-2 và MT-3). Mỗi hộp cấy 1 – 2 chủng thành những điểm. Cây xong đặt vào tủ ấm ở 30 °C trong thời gian 3 – 5 – 7 ngày các khuẩn lạc phát triển tương đối dày đủ và sinh emzyme, enzyme (nếu có) từ khuẩn lạc sẽ khuếch tán ra môi trường xung quanh và thủy phân cơ chất đặc hiệu.

3.1.3. Đánh giá kết quả

a) Hoạt tính enzyme amylase (xem hình 51 hình màu trang 365)

Ta đổ 5 ml dung dịch lugol lên mặt thạch (MT-1). Vùng thủy phân sẽ không màu (vì không còn tinh bột), phần còn lại sẽ có màu xanh có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

b) Hoạt tính enzyme cellulase

Ta đổ 5 ml dung dịch lugol lên mặt thạch (MT-2). Vùng thủy phân sẽ không màu (vì không còn CMC), phần còn lại sẽ có cánh gián có thể nhìn thấy bằng mắt thường.

c) Hoạt tính enzyme protease

Ta đổ 5 ml dung dịch (NH₄)₂SO₄ bão hòa trong nước lên mặt thạch (MT-3). Vùng thủy phân hoàn toàn trong suốt (vì không còn protein), phần còn lại sẽ có màu đục có thể nhìn thấy bằng mắt thường.



a) Hoạt tính amylase

b) Hoạt tính cellulase

c) Hoạt tính protease

Hình 51. Hoạt tính enzyme của vi sinh vật.

Các thuốc thử: Xác định hoạt tính amylase dùng thuốc thử là dung dịch lugol; cellulase – lugol, protease – (dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa trong nước).

* *Đối chứng:* Các đĩa thạch chứa MT dinh dưỡng nhưng không có VSV.

3.2. Hoạt tính kháng sinh của vi sinh vật

3.2.1. Phát hiện vi sinh vật sinh kháng sinh

Nguyên tắc: Vi sinh vật tạo kháng sinh sẽ úc chế hay tiêu diệt VSV khác và tạo ra vòng vô khuẩn xung quanh khuẩn lạc. Kích thước vòng vô khuẩn càng lớn chứng tỏ hoạt tính kháng sinh chủng đó càng mạnh.

Chuẩn bị:

– Chuẩn bị các MT thạch đĩa Petri có các chủng vi khuẩn, xạ khuẩn hay nấm mốc cần xác định hoạt tính kháng sinh.

– Chế MT nuôi cấy vi sinh vật kiểm định ở các bình nón. Để nuôi vi khuẩn dùng thạch nước thịt – peptone, nuôi vi nấm, xạ khuẩn – MT Czapek-dox.

Tiến hành:

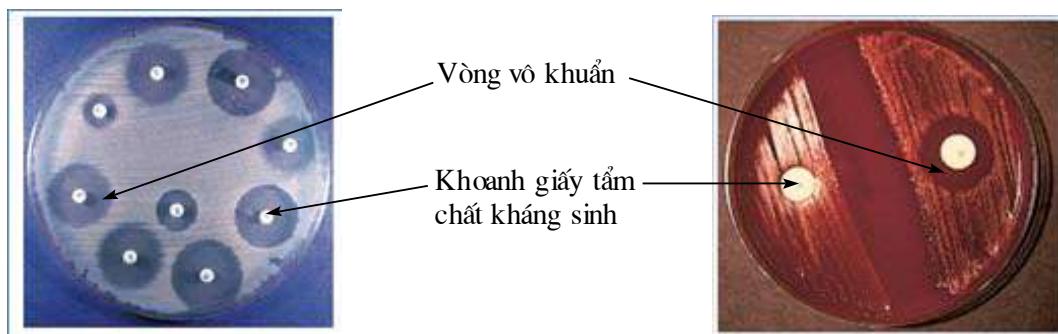
– Dùng khoan đồng khoan 1 – 3 thỏi thạch có VSV đặt vào một đĩa Petri vô trùng.

– Rót môi trường đang nóng chảy (có VSV kiểm định) vào đĩa trên sao cho môi trường ngang với bề ngang thỏi thạch (đặt sấp hay đặt ngửa thỏi thạch).

* Chọn 1 trong các VSV kiểm định sau: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, trực khuẩn sinh bào tử: *Bacillus mesentericus*, *Clostridium pasteurianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, xoắn khuẩn: *Rhodospirillum rubrum*, nấm men: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. Ellipsoïdes*, vi nấm: *Penicillium notatum*, *Aspergillus oryzae*. *Mucor mucedo*, *Rhizopus oryzae*, xạ khuẩn: *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces cylindrosporum*.

– Lật úp đĩa thạch đặt vào tủ lạnh 2 – 4 °C trong thời gian 6 giờ cho chất kháng sinh nếu có trong thỏi thạch khuếch tán ra, trong khi VSV kiểm định ngừng sinh trưởng.

– Đặt tiếp đĩa thạch trên vào tủ ấm 30 °C. Sau 2 ngày quan sát, nếu có vòng vô khuẩn chứng tỏ chủng vi sinh vật đó sinh chất kháng sinh.



Hình 52. Vòng vô khuẩn tạo thành quanh các khoanh giấy tẩm chất kháng sinh.
(Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002) (Xem hình màu 52 trang 365).

Dánh giá kết quả: Kích thước vòng vô khuẩn bằng $D - d$ (mm). Trong đó D là đường kính vòng vô khuẩn, d là đường kính lỗ khoan đo bằng mm.

Có vòng vô khuẩn chúng tôi chúng VSV đó có tạo ra kháng sinh, kích thước vòng vô khuẩn càng lớn chứng tỏ hoạt tính kháng sinh chúng đó càng mạnh.

3.2.2. Phát hiện vi sinh vật sinh kháng sinh bằng phương pháp đục lỗ

Đây là phương pháp thử hoạt tính kháng sinh trong dung dịch. Trước hết phải nuôi cấy VSV cần xác định hoạt tính kháng sinh trong môi trường dịch thết để chúng tạo ra kháng sinh. Sau đó dùng khoan đồng ($\varnothing = 1$ cm) khoan các lỗ trên môi trường thạch đã cấy vi khuẩn kiểm định ở hộp Petri, nhỏ vào mỗi lỗ thạch 0,1 ml dịch nuôi cấy VSV cần thử. Tiếp theo đặt các hộp Petri vào ngăn mát tủ lạnh 2 – 6 °C trong thời gian 6 giờ cho chất kháng sinh trong dịch nuôi cấy (nếu có) khuếch tán ra xung quanh trong khi vi khuẩn kiểm định trong MT thạch đĩa bị ức chế. Kế tiếp ta đặt các hộp thạch trên vào tủ âm 30 °C/24 giờ cho VSV kiểm định phát triển. Nếu chủng VSV đó tạo ra kháng sinh sẽ tiêu diệt hoặc ức chế VSV kiểm định và tạo thành vòng vô khuẩn xung quanh lỗ đục. Dựa vào hiệu số vòng vô khuẩn ($D - d$ mm; D : đường kính vòng vô khuẩn, d : đường kính lỗ khoan) để biết hoạt tính kháng sinh mạnh hay yếu.

3.3. Làm kháng sinh đồ

Là kỹ thuật xác định độ nhạy – kháng của kháng sinh đối với vi sinh vật kiểm định trên môi trường in vitro.

Có nhiều kỹ thuật khác nhau để làm *kháng sinh đồ* trong phòng thí nghiệm. Nguyên thủy nhất là phương pháp pha loãng đo độ đục. Phổ biến hơn là phương pháp đặt khoanh giấy tẩm kháng sinh. Hiện đại nhất là phương pháp làm *kháng sinh đồ* tự động bằng máy.

Tuy nhiên, chúng tôi đề cập đến kỹ thuật đang được thực hiện thường quy trong các phòng thí nghiệm vi sinh học môi trường hiện nay: kỹ thuật đặt khoanh giấy tẩm kháng sinh.

Đây là kỹ thuật đặt khoanh giấy tẩm một loại kháng sinh với một nồng độ nhất định lên một đĩa thạch cấy VSV cần thử hoạt tính kháng sinh. Sau đó dựa vào các xác định đường kính vòng vô khuẩn, đối chiếu với tài liệu tham chiếu (CLSI hoặc EUCAST,...) để kết luận độ nhạy/kháng/trung gian của kháng sinh đó với vi sinh vật thử.

a) Chuẩn bị

– Pha môi trường, khử trùng, đỗ đĩa rồi ủ ám khoảng 15 – 20 phút.

– Pha huyền dịch vi sinh vật thử hoạt tính kháng sinh: Lấy khuẩn lạc thuận trên đĩa phân lập, hòa tan vào dung dịch nước muối NaCl 0,9%. Kiểm tra nồng độ huyền dịch bằng cách đo OD, mỗi loại vi khuẩn Gram (-), Gram (+), nấm... đều có nồng độ chuẩn theo các tài liệu tham chiếu.

b) Tiến hành

– Dùng tăm bông vô trùng, thấm huyền dịch vi khuẩn thử hoạt tính (chú ý không thấm quá đậm hoặc quá khô sẽ ảnh hưởng đến độ chính xác của kết quả).

– Quét tăm bông tẩm huyền dịch vi khuẩn thử hoạt tính phủ kín lên trên bề mặt thạch, đảm bảo phủ kín và đều trên bề mặt thạch.

– Dùng kẹp kim loại vô trùng gấp một khoanh giấy kháng sinh, nhẹ nhàng đặt lên một vị trí cố định trên bề mặt thạch. Chú ý chỉ đặt một lần, không ấn mạnh hay làm di chuyển vị trí khoanh giấy. Thông thường một đĩa thạch đường kính 90 mm sẽ đặt được tối đa 2 – 5 khoanh giấy tẩm kháng sinh.

– Đặt vào tủ lạnh 2 giờ cho chất kháng sinh khuếch tán, sau đó đem đặt vào tủ âm 30 °C cho VSV thử hoạt tính sinh trưởng. Sau 24 giờ lấy ra xem và đo vòng vô khuẩn.

* Đôi chứng: Thay khoanh giấy tẩm kháng sinh bằng khoanh giấy tẩm nước cát.

Để đảm tính chính xác của thí nghiệm, có thể đổi chứng bằng chủng chuẩn ATCC theo hướng dẫn của tài liệu tham chiếu.

+ *Escherichia coli* ATCC 25922

+ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

+ *Streptococcus faecalis* ATCC 29212

+ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853...

c) Đánh giá kết quả

– Quan sát sự tạo thành vòng vô khuẩn: Nếu các VSV nghiên cứu tạo ra các chất kháng sinh chống lại các VSV kiểm định thì vùng môi trường xung quanh khói thạch có vòng vô khuẩn chứng tỏ chứng VSV đó có tạo ra kháng sinh.

– Đánh giá sơ bộ khả năng tạo thành kháng sinh dựa vào độ lớn của vòng vô khuẩn: dùng thước kẻ đo đường kính vòng vô khuẩn, nếu đường kính càng lớn chứng tỏ hoạt tính kháng sinh chủng đó càng mạnh.

– So sánh đường kính vòng vô khuẩn với bảng giới hạn đường kính vùng ức chế để phân loại mức độ của vi khuẩn thành nhạy cảm (S), nhạy cảm vừa (I), đề kháng (R).

Bảng giới hạn đường kính vùng ức chế để phân loại vi khuẩn nhạy cảm (S), (I) và đề kháng (R).

Kháng sinh	Nồng độ (ug/khoanh)	Đường kính vùng ức chế (mm)		
		S	I	R
Ampicillin	10	≥ 22	21 – 11	< 11
Benzylpenicillin	10	≥ 27	26 – 16	< 16
Chloramphenicol	30	≥ 24	–	< 24
Erythromycin	15	≥ 28	27 – 20	< 20
Gentamycin	30	≥ 18	17 – 15	< 15
Tetracyclin	30	≥ 28	27 – 16	< 16
Kanamycin	30	≥ 17	16 – 9	< 9

3.4. Dùng sắc ký giấy để xác định trị Rf các chất kháng sinh

– Nuôi nấm mốc, xạ khuẩn cho mọc kín trên bề mặt đĩa thạch 3 đĩa Petri/ loại VSV.

– Đỗ dung môi (n-butanol hay cồn vào MT thạch đĩa có khuẩn lạc VSV sinh kháng sinh từ 30 – 60 phút. Để dung môi bay hơi tự nhiên, dung dịch còn lại là dung dịch chứa amino acid hay CKS (chất kháng sinh khô).

– Châm dịch trên vào giấy sắc ký và chạy sắc ký trong các hệ dung môi:

n-Butanol : acid acetic : nước (4 : 1 : 5).

Methanol : acid acetic : nước (16 : 1 : 3).

Chloroform : methanol : (NH₄)SO₄ 17% (2 : 1 : 1).

Hiện hình theo phương pháp sinh học (đặt giấy sắc ký (đã cắt thành từng đoạn ngắn) lên bề mặt đĩa thạch có VSV kiểm định, đặt lạnh 2 giờ, nuôi 30 °C sau 2 – 5 ngày lấy ra xem vùng vô khuẩn). Xác định trị Rf.

Hiện hình theo phương pháp hóa học (làm khô giấy đã chạy sắc ký rồi nhúng vào dung dịch ninhydrin 5% trong acetone, sấy khô giấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 80 °C). Xem vệt màu và xác định trị Rf.

$$Rf = \frac{\text{Khoảng dịch chuyển của chất thử}}{\text{Khoảng dịch chuyển của dung môi}}$$

Công việc của nhóm:

– Xác định hoạt tính amylase, protease và cellulase (3 đĩa Petri/thí nghiệm).

– Mỗi phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh làm 3 đĩa Petri (PP thỏi thạch – 3, PP dùng đĩa kháng sinh – 3 và phương pháp dùng dịch CKS pha loãng – 3).

– Sắc ký giấy dịch chiết VSV (chất kháng sinh khô) trong ba hệ dung môi trên.

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. Phương pháp xác định chủng VSV sinh enzyme cellulase?
2. Nêu nguyên tắc xác định hoạt tính của enzyme vi sinh vật?
3. Cho biết cách xác định VSV phân hủy rác thải hữu cơ chứa cellulose?
4. Cho biết cách xác định VSV phân hủy rác thải hữu cơ chứa tinh bột?
5. Cho biết cách xác định VSV phân hủy rác thải hữu cơ chứa protein?
6. Nêu nguyên tắc và phương pháp xác định hoạt tính kháng sinh của VSV theo phương pháp thỏi thạch?
7. Các bước xác định hoạt tính kháng sinh của VSV theo phương pháp đục lỗ?
8. Nêu nguyên tắc và phương pháp sắc ký giấy chất kháng sinh của VSV?
9. Phân biệt phương pháp hiện hình sinh học với phương pháp hiện hình hóa học khi xác định trị Rf trong sắc ký giấy.
10. Phương pháp phát hiện vi sinh vật sinh kháng sinh?

BÀI 9. PHÂN TÍCH VI SINH VẬT TRONG CHẤT THẢI HỮU CƠ

I. NGUYÊN LÝ

VSV trong chất thải hữu cơ rất đa dạng tùy thuộc vào nguồn gốc chất thải. Khi phân tích VSV trong chất thải, người ta thường kiểm tra số lượng VSV hiếu khí và các vi khuẩn gây bệnh như *Coliform*, *Fecal coliform*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*...

Về quan hệ với oxy vi sinh vật được chia ra:

– Vi sinh vật hiếu khí bắt buộc: VSV chỉ sinh trưởng khi có oxy vì oxy là chất nhận điện tử cuối cùng. Chúng có khả năng sinh enzyme catalase và superoxide dismutase (SOD). Ví dụ: đa số các loại vi khuẩn, nấm mốc, ĐVNS.

– Vi sinh vật kỵ khí bắt buộc: Chỉ sinh trưởng được trong môi trường không có oxy, vì chất nhận điện tử cuối cùng không phải oxy phân tử mà là oxy liên kết. Chúng không có khả năng sinh catalase và SOD. Ví dụ vi khuẩn sinh methane, vi khuẩn phản nitrate hóa.

– VSV kỵ khí tùy tiện: VSV không cần oxy cho sinh trưởng nhưng có oxy sẽ sinh trưởng tốt hơn. Chúng sinh cả catalase và SOD. Ví dụ *E. coli*, nấm men rượu. Nếu có oxy chúng tiến hành hô hấp tế bào, khi không có oxy chúng tiến hành lên men (*E. coli* lên men lactic, nấm men lên men rượu).

– VSV kỵ khí chịu khí (*aerotolerant anaerobes*): Chúng có thể sinh SOD nhưng không sinh catalase. Chúng có thể sinh trưởng được khi có hoặc không có oxy. Ví dụ: *Lactobacillus* khi nuôi cấy trong ống nghiệm thạch đứng: phía trên mặt – hô hấp, phía dưới lên men.

– VSV vi hiếu khí: sinh trưởng ở môi trường có nồng độ oxy rất thấp 2 – 10% và bị chết khi nồng độ oxy là 20%, chúng chỉ sinh SOD nhưng không sinh catalase. Ví dụ vi khuẩn giang mai (*Treponema pallidum*, vi khuẩn viêm loét dạ dày (*Helicobacter pylori*)).

Vi khuẩn Coli (*Total coliform*) tồn tại trong tự nhiên, trong phân người, phân gia súc, trong nước, trong nước thải hay trong các vật phẩm có nguồn gốc khác nhau. Theo đặc tính nuôi cấy, người ta chia chúng làm hai nhóm:

– Fecal Coli (*Escherichia coli* – *E.coli*) có nguồn gốc từ phân (người, động vật, cá..):

Fecal Coliform hay *F. coli* là một loại vi khuẩn Gram âm, kỵ khí, hình que, không tạo bào tử. Vi khuẩn coliform thường có nguồn gốc từ ruột của các động vật máu nóng. Coliform phân có khả năng phát triển trong môi trường có mặt các muối mật. Khi thử phản ứng sinh hóa, chúng có đặc điểm oxydase âm tính và tạo ra acid và khí từ lactose trong vòng 48 giờ ở nhiệt độ $44 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Thuật ngữ "coliform chịu nhiệt" chỉ nhóm này thì chính xác hơn và đang được chấp nhận hơn là "coliform phân".

– Non fecal Coli (*Bacterium coli*) có nguồn gốc khác (đất, cây cỏ, nước thải...):

Vi khuẩn *E.coli* thuộc nhóm vi khuẩn đường ruột *Enterobacteriaceae* chúng hiện diện nhiều ở đại tràng nên còn gọi là vi khuẩn đại tràng. Vi khuẩn *E.coli* nhiễm vào đất, nước... từ phân của động vật. Sự có mặt của chúng chứng tỏ nước bị nhiễm phân hoặc nước thải sinh hoạt. Chúng sẽ gây bệnh khi gặp điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của chúng.

– Hình dạng: Vi khuẩn này thuộc loại trực khuẩn Gram âm, di động bằng roi quanh tế bào, không tạo bào tử, loại có độc lực thì có capsul, loại không có độc lực không có capsul. Kích thước trung bình ($0,5 \mu\text{m} \times 1 - 3 \mu\text{m}$) hai đầu tròn. Một số dòng có lông bám (pili).

– Đặc điểm nuôi cây và sinh hóa: Vi khuẩn *E. coli* là loại vi khuẩn ký khí tùy tiện. Nhiệt độ thích hợp 37°C nhưng có thể mọc trên 40°C , pH 7,4.

– Trên môi trường VRBA (Thạch Violet red bile) tạo khuẩn lạc màu tím.

– *E.coli* gây bệnh truyền nhiễm tiêu chảy hay nhiễm trùng huyết trẻ sơ sinh (không phải tất cả *E. coli* đều gây bệnh, chỉ có *E.coli* với type huyết thanh là 0157H7 mới gây bệnh). Ngoài ra, nước thải nhiễm *E.coli* còn có thể nhiễm các VSV khác có trong đường ruột như vi khuẩn tả (*Vibrio cholera*), vi khuẩn lỵ (*Shigella*)...

II. THỰC HÀNH

1. Mục đích yêu cầu

Biết cách tiến hành các thí nghiệm xác định được các vi khuẩn gây bệnh trong nước thải (*E.coli*, *Coliform*, *Fecal coliform*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*...).

2. Mẫu vật, dụng cụ và hóa chất

2.1. Mẫu vật và thiết bị

– Mẫu đất 200 g, nước thải 2000 ml, rác thải hữu cơ rắn mỗi loại 200 g (trái cây bị hỏng, rác đang phân hủy...).

- Tủ âm: $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, tủ lạnh, ống nghiệm, pipette.

2.2. Các môi trường xác định đặc và dịch thể

* Các MT xác định đặc tính sinh hóa của một số vi khuẩn gây bệnh thường sử dụng 4 loại môi trường sau (*xem thực hành bài 2, 4 và 5*).

- 1) Môi trường Kligler KIA) (pH 7,4).
 - 2) Môi trường urea indole (pH 7,0).
 - 3) Môi trường Manit – di động (pH 7,6).
 - 4) Môi trường LDC (*Lysine decarboxylase*) (pH 7,5).

L-Lysine monochlohydrat.....	5 g	Glucose.....	1 g
Cao men.....	3 g	Cồn 95 ⁰	1 ml
NaCl	5 g	Nước cát.....	1000 ml

5) Nước thịt – Peptone – Lactose (Nhận diện và kiểm tra số lượng E.coli)

Rót 5 ml vào mỗi ống nghiệm, có đặt sẵn ống sinh hơi Durham. Khử trùng 121 °C trong 20 phút.

(*) Cách pha chỉ thị màu đỏ phenol:

6) Môi trường thạch sunfite – fuchsine (pH 7,5)

Thạch – nước thịt – peptone.....	500 ml
Lactose.....	10 g
Na ₂ SO ₄	2,5 g
K ₂ HPO ₄	3,5 g
Fuchsine kiềm.....	0,4 g

7) Các MT điều chế sẵn

- Saline Peptone Water (SPW); Plate count agar (PCA) ...
 - Dung dịch Saline (SPW); Canh brilliant green bile lactose (BGBL).
 - Thạch eosin methylene blue lactose (EMB).
 - Canh Methyl Red Voges Proskauer (MR-VP).
 - Canh Tryptone (hoặc peptone); Thạch Simmons Citrate
 - Thuốc thử Methyl red 0,2%, α-naphtol 5%, thuốc thử kowacs'.

2.3. Dung dịch đệm phosphate (để pha loãng đất và rác thải hữu cơ rắn)

Dung dịch A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 11,876 g
Nước cất 2 lần 1000 ml

Dung dịch B: KH₂PO₄..... 9,078 g
Nước cất 2 lần 1000 ml

Để có pH 7,4 thì cho 182 ml dung dịch B vào 818 ml dung dịch A.

3. Các bước tiến hành

3.1. Xác định tổng số vi sinh vật hiệu khí

a) *Nguyên tắc*: Tổng vi sinh vật hiếu khí được đếm bằng cách đỗ thạch đĩa và ủ trong điều kiện hiếu khí ở 30°C trong 72 giờ.

b) Tiến hành:

- Hòa tan 22,5 g vào 1000 ml nước, đun sôi cho tan rồi hấp khử trùng 15 phút ở 121 °C
 - Đỗ đĩa: Chuyển 1ml dung dịch dung dịch mẫu sau khi đã pha loãng ở nồng độ thích hợp vào đĩa Petri vô trùng, mỗi nồng độ 3 đĩa, mỗi đĩa 15 – 20 ml môi trường Plate

count agar (PCA) đã được làm nguội đến 45 °C. Sau đó trộn đều mẫu vào môi trường nuôi cấy. Lật ngược và đặt vào tủ ấm ở 30 °C/72 giờ.

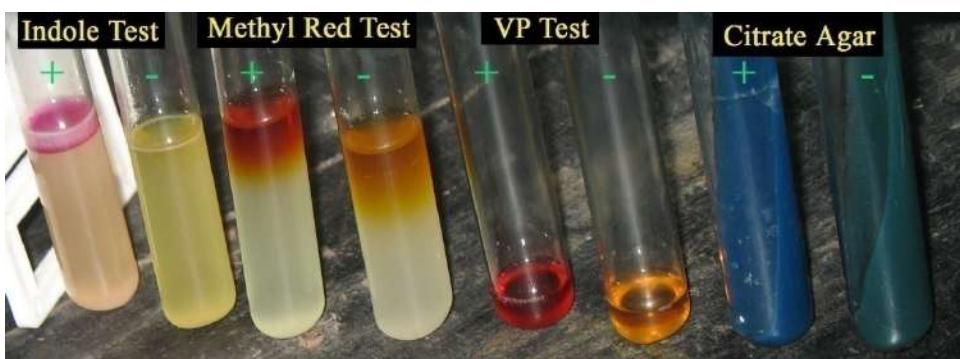
c) *Dánh giá kết quả*: Dùng mắt thường hoặc kính lúp để đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa Petri (chỉ đếm đĩa Petri có số khuẩn lạc 30 – 350 khuẩn lạc) sau đó nhân với hệ số pha loãng.

3.2. Phân tích vi sinh vật gây bệnh trong chất thải hữu cơ

Xác định sự có mặt của một số vi sinh vật gây bệnh

3.2.1. Xác định *Escherichia coli* trong nước thải

a) *Nguyên tắc*: Phát hiện *E.coli* trong nước thải dựa vào đặc điểm hình thái trên kính hiển vi, đặc điểm nuôi cấy trên MT thạch MacConkey (hoặc thạch Brilliant green), một số phản ứng sinh hóa đặc trưng và thử nghiệm IMVIC (xem hình màu 53 trang 365).



Hình 53. Thử nghiệm IMVIC: Dùng để phân biệt *E.coli* với các vi khuẩn đường ruột khác.

b) Chuẩn bị môi trường và nguyên liệu

– Thạch máu cơ bản (Blood agar base); Thạch MacConkey (hoặc thạch Brilliant green), MT VP-MR; Nước peptone; Môi trường Cimon Citrate, Máu bò, bê hoặc cừu.

c) Nuôi cấy, phân lập vi khuẩn *E. coli*

Mẫu nước thải được nuôi cấy trên môi trường: Thạch máu, thạch MacConkey (nếu không có thạch MacConkey thì có thể thay bằng thạch Brilliant green). Nuôi ở 37 °C trong điều kiện hiếu khí 24 giờ.

d) Xác định đặc tính sinh hóa (xem thực hành bài 5)

Một số đặc tính sinh hóa đặc trưng của vi khuẩn *E.coli*:

– Indole (+), đỗ methyl (+), MR (+) Vosges Proskauer (-), citrate (-), lactose (+) dung huyết (±).

– Trên môi trường thạch MacConkey khuẩn lạc *E.coli* có màu hồng đậm, nhám, đường kính 2 – 4 mm.

– Trên MT thạch Brilliant green khuẩn lạc *E.coli* màu vàng và MT trở nên vàng chanh.

– Thạch máu: *E. coli* gây bệnh phù thường gây dung huyết thạch máu. Khuẩn lạc màu trắng xám, tròn, bóng.

e) Kiểm tra hình thái vi khuẩn trên kính hiển vi

Lấy que cây chấm vào khuẩn lạc nghi ngờ trên thạch máu, hòa vào giọt nước sinh lý trên phiến kính hoặc lấy một vòng que cây canh trùng đã nuôi cấy vi khuẩn giàn mỏng trên phiến kính, để khô, rồi cố định tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn.

Tiêu bản sau khi đã được cố định, nhuộm bằng phương pháp Gram (xem bài 1). Xem tiêu bản bằng vật kính dầu ($\times 100$).

Vi khuẩn bắt màu đỏ (màu Gram âm), dạng trực khuẩn ngắn, cầu khuẩn hoặc hình bầu dục, đứng rải rác, không thành chuỗi.

– Sau khi kiểm tra hình thái trên kính hiển vi, cây khuẩn lạc vào môi trường thạch McConkey.

– Chọn khuẩn lạc có màu hồng đậm trên thạch McConkey cây vào môi trường nước thịt hay nước peptone để tiếp tục kiểm tra các đặc tính sinh hóa.

– Thủ nghiệm IMVIC

IMVIC = sinh Indol, methyl red (MR), Voges-Proskauer (VP) và citrate.

Từ những khuẩn lạc có màu hồng đậm trên thạch MacConkey và gây dung huyết trên thạch máu, tiến hành làm phản ứng IMViC.

Vi khuẩn *E. coli* có IMVIC = I+M+V⁻I⁻C⁻

+ Sinh Indol: cây khuẩn lạc vào môi trường nước peptone hay môi trường có chứa tryptophan, nuôi ở 37°C từ 18 giờ đến 24 giờ. Nhỏ 0,2 ml đến 0,3 ml thuốc thử Kovacs vào môi trường đã nuôi cây vi khuẩn, nếu trên bề mặt môi trường có vòng màu đỏ là phản ứng dương tính.

+ VP: Cây khuẩn lạc nghi ngờ vào môi trường nước VP-MR, nuôi ở 37°C sau 24 giờ nhỏ vào môi trường nuôi cây trên 5 giọt thuốc thử VP (xem phần phụ lục), đọc kết quả sau 2 phút, nếu có màu đỏ hồng là dương tính, không biến màu hoặc màu vàng là âm tính.

+ MR: Cây khuẩn lạc nghi ngờ vào môi trường nước VP-MR, nuôi ở 37°C sau 24 giờ nhỏ vào môi trường nuôi cây trên 5 giọt dung dịch đỏ methyl trong cồn 95° (xem phần phụ lục), đọc kết quả sau 5 phút, nếu có màu đỏ là phản ứng dương tính, có màu vàng là âm tính.

+ Citrate: kiểm tra sự sử dụng citrate của vi khuẩn. Cây khuẩn lạc vào thạch simon citrate nuôi ở 37°C từ 18 giờ đến 24 giờ. Vi khuẩn sử dụng citrate (dương tính) làm môi trường chuyển từ màu xanh lá cây sang màu xanh nước biển. Âm tính khi môi trường giữ nguyên màu xanh lá cây.

g) Đánh giá kết quả

– Thủ nghiệm IMVIC của *E.coli* là: I+M+V⁻I⁻C⁻: indole (+), đỏ methyl (+), Vosges Proskauer (-), lên men đường inositol (-), citrate simmons (-).

- Trên môi trường thạch *MacConkey* khuẩn lạc *E.coli* có màu hồng đậm, nhám, đường kính 2 – 4 mm. Trên môi trường thạch *Brilliant green* khuẩn lạc *E.coli* màu vàng và môi trường trở nên vàng chanh.

3.2.2. Xác định Coliform tổng số theo phương pháp xác định số có xác suất cao nhất MPN

- a) *Nguyên tắc*: Dựa vào sự lên men đường lactose ở môi trường thích hợp (thạch Violet red bile) ở 37 °C trong 24 giờ. Sau đó được khảng định lại trong MT Canh Brilliant Green Bile Salt (BGBL). Coliforms sẽ sinh khí trong môi trường này ở 37 °C trong 24 giờ.

Phương pháp này dựa trên đặc tính của Coliform là có khả năng lên men đường lactose và tạo thành bọt khí.

b) Chuẩn bị

- Pha chế môi trường để xác định Coliform tổng số (1):

<i>Thành phần</i>	<i>Môi trường đặc</i> (g/l)	<i>Môi trường loãng</i> (g/l)
Tryptose	40	20
Lactose	10	5
K ₂ HPO ₄	5,5	2,75
NaCl	10	5
Natri lauryl sulfate	0,2	0,1

Môi trường được đưa vào ống nghiệm (1,5 cm × 16 cm) chứa ống Durham (0,2 cm × 3 cm) đặt ngược. Khử trùng ở 121 °C ± 1 °C trong 15 phút.

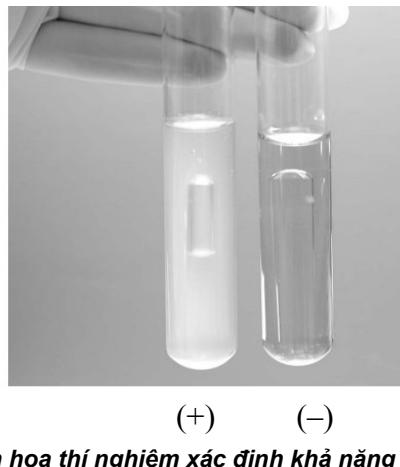
- Pha chế môi trường để khảng định chắc chắn hơn Coliform (2):

Peptone.....	10 g	Xanh Brillan	0,0133 g
Lactose.....	10 g	Nước cất.....	1000 ml
Mật bò khô	20 g		

Cách chuẩn bị môi trường tương tự như trên.

c) Tiến hành

- Lấy 5 ống môi trường đặc, thêm 10 ml mẫu vào mỗi ống.
- Chuẩn bị 5 ống môi trường loãng, thêm vào 1 ml mẫu; 5 ống môi trường loãng tiếp theo được thêm 1 ml mẫu pha loãng (10^{-1}). Nếu mẫu bẩn thì cần pha loãng tiếp, mỗi độ pha loãng lại được bơm vào 5 ống môi trường loãng.
- Ủ ở nhiệt độ 37 °C trong 24 giờ.



Hình 54. Ảnh minh họa thí nghiệm xác định khả năng sinh khí CO₂.
(I.L. Pepper và C.P. Gerba, 2004).

c) *Đánh giá kết quả*

- Đếm số ống dương tính (ống có tạo thành khí trong ống Durham), tra bảng sẽ xác định được lượng Coliform.
- Để khẳng định chắc chắn hơn đối với Coliform sử dụng môi trường (2), cũng dựa vào khả năng tạo khí trong ống Durham.

3.2.3. Phương pháp xác định Fecal coliform (M-FC)

Môi trường xác định:

Peptone	10 g	Muối mật	1,5 g
Triptose	5 g	Aniline blue	0,1 g
Lactose	12,5 g	Dịch chiết nấm men.....	3ml
Nước cất	1000 ml	NaCl.....	5 g
Nếu làm MT đặc thêm 20 g thạch (agar).			

Dặc điểm xác định: Trên môi trường này khuẩn lạc *Fecal coliform* bắt màu xanh, mặt nhẵn bóng. Môi trường này cho phép sự phát triển của *Fecal coliform* ở nhiệt độ cao 44,5 °C.

3.2.4. Phương pháp xác định *Salmonella*

Salmonella là những trực khuẩn dài 0,6 – 0,8 µm, có nhiều lông xung quanh thân, rất di động, không có vỏ, không sinh nha bào, bắt màu Gram âm, là tác nhân gây bệnh thương hàn.

*Môi trường phân lập *Salmonella* (MT xanh Brillant) (pH 7,0 – 7,2):*

Cao thịt.....	3 g	Đỗ phenol (0,2%)	40 ml
Peptone.....	10 g	Xanh Brillant (0,5%)	2,5 ml
NaCl	5 g	Thạch (agare)	20 g
Lactose	10 g	Nước cất	960 ml
Khử trùng 110 °C trong 30 phút.			

Đặc điểm khuẩn lạc: Trên môi trường này khuẩn lạc *Salmonella* có màu hồng nhạt, mờ, đường kính khuẩn lạc 1 – 3 mm.

Tiêu chuẩn xác định *Salmonella* dựa vào các đặc tính sinh hóa:

- Lên men đường glucose kèm theo sinh hơi (trừ *Salmonella typhi*).
- Không lên men đường lactose, saccharose.
- Indol (-), Urease (-), Sinh H₂S có thể rất ít trừ *Sal. paratyphi A*.
- LDC (+), VP (-), RM (+); ONPG (-).

Cáy khuẩn lạc nghi ngờ lên bốn loại MT (*Kligler KIA, urea indole, Mannite – di động* và *LDC*). Để tủ âm 37 °C trong 24 giờ, đọc kết quả rồi chẩn đoán theo định hướng sau:

Lactose (+)	Mannite (+)	LDC (+) trừ <i>S.paratyphi</i>
Gluose (+)	Indole (-)	H ₂ S(+) trừ <i>S.paratyphi</i>
Di động (+)	Hơi (+) trừ <i>S.paratyphi</i>	

3.2.5. Phương pháp xác định *Shigella*

Shigella có hình thẳng dài 1 – 3 µm, không có lông, không di động, không có vỏ, không sinh nha bào, bắt màu Gram âm, là vi khuẩn gây bệnh ly.

Môi trường để phân lập Shigella DCL (Deoxycholatecitratelactose) (pH 7,3 – 7,5)

Peptone.....	5 g	Citrate sắt.....	1 g
Cao thịt	5 g	Natri deoxycholate.....	5 g
Lactose	10 g	Đỗ trung tính (1%).....	2,5 ml
Natri citrate	8,5 g	Thạch (agar.....	20 g
Natri hyposulfite	8,5 g	Nước cất.....	1000 ml

Khử trùng 110 °C trong 15 phút.

Đặc điểm khuẩn lạc: Trên môi trường DCL khuẩn lạc *Shigella* có màu hồng nhạt.

Tiêu chuẩn xác định dựa vào các đặc tính sinh hóa:

Khuẩn lạc nghi ngờ được cấy lên bốn loại MT, rồi chẩn đoán theo hướng:

Các loài	<i>Urea indole</i>		<i>Mannite – di động</i>		<i>Kligler</i>			<i>LDC</i>
	Urease	Indole	Di động	Mannite	Sinh hơi	Lactose	H ₂ S	LDC
<i>S. dysenteriae</i>	–	d	–	–	–	–	–	–
<i>S. boydii</i>	–	d	–	+	–	–	–	–
<i>S.sonnei</i>	–	–	–	+	–	–	–	–

d: Khác nhau tùy từng type

Tiêu chuẩn xác định *Shigella* dựa vào các đặc tính sinh hóa:

– Lên men đường glucose không sinh hơi (trừ một vài type như *Shi. flexneri* 6, *Shi boydii* 14).

– Không lên men đường lactose (trừ một vài type lên men chậm).

– Không lên men đa số các loại đường thông thường.

– H₂S (-), Indole (-), Citrate (-)

3.2.6. Phương pháp xác định *Vibrio cholerae* (pH 8,5 – 9,5)

Phẩy khuẩn tả có hình hơi cong như dấu phẩy, kích thước (2 – 4) µm × (0,3 – 0,6) µm, thường có một lông ở một đầu, rất di động, không có vỏ, không sinh nha bào, bắt màu Gram âm, là tác nhân gây bệnh tả.

Môi trường phân lập TCBS (Thiosulphate – Citrate – Bile salts – Sucrose):

Peptone.....	10 g	NaCl.....	10 g
Cao men	5 g	Saccharose	20 g
Natri citrate	10 g	Xanh bromothymol (0,2%)	20 ml
Natri thiosulfate.....	10 g	Xanh thymol (1%)	4 ml
Mật bò khô	5 g	Thạch	15 g
Natri cholate.....	3 g	Nước cất.....	1000 ml
Citrate sắt.....	1 g		

Đặc điểm khuẩn lạc: Trên môi trường TCBS, phẩy khuẩn tả có khả năng lên men saccharose nên khuẩn lạc có màu vàng, to và nhẵn, các vi khuẩn khác có màu xanh.

Tiêu chuẩn xác định *Vibrio cholerae* dựa vào các đặc tính sinh hóa:

– Lên men đường glucose, saccharose, mannose, không sinh hơi

– Không lên men đường arabinose, lactose, di động mạnh

– Indole(+), oxydase (+), VP (±), urease (-), H₂S (-), RM (-)

3.2.7. Phương pháp xác định *Pseudomonas aeruginosa*

Trục khuẩn mủ xanh *Pseudomonas aeruginosa* có hình dạng thăng, hai đầu tròn, dài (1 – 5) µm, rộng (0,5 – 1) µm. Trục khuẩn ít khi có vỏ, có một roi ở một đầu, di động, không sinh bào tử, bắt màu Gram âm.

Môi trường phân lập *Pseudomonas aeruginosa* (Môi trường SS) : (pH 7,0 – 7,2)

Peptone.....	5 g	Citrate sắt.....	1g
Cao thịt.....	5 g	Xanh brillia 0,1%	0,3 ml
Lactose	10 g	Đỏ trung tính 1%	2,5 ml
Muối mật.....	8,5 g	Thạch	20 g
Natri citrate	8,5 g	Nước cất.....	1000 ml
Natri thiosulfate.....	8,5 g	pH	7,0 – 7,2

Đặc điểm khuẩn lục: có hai dạng: Khuẩn lục tròn đều, mặt nhẵn và khuẩn lục có bờ dẹt, nham nhở, vùng trung tâm lồi. Khuẩn lục của *Pseudomonas aeruginosa* thường có ánh xanh, tiết sắc tố màu xanh lục hoặc vàng lục. Vi khuẩn thường nhiễm vào các vết thương hở tạo mủ xanh nên gọi là vi khuẩn mủ xanh.

Tiêu chuẩn xác định Pseudomonas aeruginosa dựa vào các đặc tính sinh hóa:

Glucose (+)	Indole (-)	LDC (-) Sinh sắc tố màu xanh lục
Lactose (-)	H ₂ S (-)	Oxydase (+)

4. Viết tường trình chi tiết

III. CÂU HỎI

1. *Fecal coliform* là gì? Tại sao phải nhận biết Coliform và *Fecal coliform*?
2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy Coliform?
3. Nguyên tắc và phương pháp xác định *Coliform*? *Fecal coliform*?
4. Nguyên tắc và phương pháp xác định vi khuẩn *Salmonella*? *Shigella*?
5. Nguyên tắc và phương pháp xác định vi khuẩn *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*?
6. Nhận xét về mẫu được phân tích so sánh mẫu phân tích theo TCVN?
7. Khi thực hiện các phản ứng sinh hóa cần lưu ý những điểm gì?

BÀI 10. THAM QUAN THỰC TẾ CƠ SỞ XỬ LÝ CHẤT THẢI

1. Mục tiêu

- Nhằm trang bị kiến thức thực tế cho sinh viên về ứng dụng VSV sản xuất và xử lý ô nhiễm môi trường.
 - Sau khi học xong sinh viên phải viết bài thu hoạch về đợt tham quan, thực tế.

2. Nội dung và địa điểm

2.1. Phương pháp thu mẫu và điều tra thực địa

- Đo tại hiện trường các chỉ tiêu:
 - + Nhiệt độ (bằng nhiệt kế);
 - + pH (bằng máy đo pH);
 - + Oxy hòa tan (bằng máy đo DO).
 - Mẫu thủy hóa được đựng trong các lọ nhựa, đậy kín nút, nước được phân tích ngay sau khi mang về phòng thí nghiệm.
 - Mẫu để xác định VSV được lấy vào lọ thủy tinh có nút mài đã được khử trùng từ trước. Mẫu được phân tích ngay sau khi mang về phòng thí nghiệm.

2.2. Các chỉ tiêu VSV và chỉ tiêu thủy hóa được phân tích

2.2.1. Các chỉ tiêu VSV

- Các VSV thông thường: vi khuẩn, xạ khuẩn, vi nấm, vi khuẩn quang hợp.
 - *Coliform* tổng số – *Fecal Coliform*
 - *Salmonella* – *Shigella*
 - *Vibrio cholerae* – *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.2. Các chỉ tiêu thủy hóa

- Độ đục.
 - Chất rắn lơ lửng (SS).
 - H₂S.
 - Hàm lượng oxy hòa tan (DO).
 - Nhu cầu oxy sinh hóa (BOD₅).
 - Nhu cầu oxy hóa học (COD).
 - NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻.

2.3. Địa điểm

- Viện Sinh học, Viện Khoa học Việt Nam.
- Các phòng thí nghiệm VSV hiện đại chuyên phục vụ giảng dạy và nghiên cứu về lĩnh vực môi trường.
- Nhà máy hay xí nghiệp xử lý phế thải đô thị ở các thành phố, các tỉnh.

3. Viết bài thu hoạch (theo hướng dẫn của giảng viên)

CÂU HỎI ÔN TẬP VÀ GỢI Ý TRẢ LỜI CÁC BÀI TẬP

I. Câu hỏi ôn tập

1. Vi sinh vật học môi trường? Vai trò của các vi sinh vật trong môi trường tự nhiên?
2. Các nhóm vi sinh vật môi trường chủ yếu? Tại sao nói vi sinh vật là một hợp phần của môi trường sống?
3. Các loại virus? Đặc điểm chung của virus? Virus khác biệt với các vi sinh vật khác ở các đặc điểm nào?
4. Quá trình nhân lên của virus trong tế bào chủ?
5. Trình bày chi tiết sự phát triển của vi khuẩn? Phân biệt vi khuẩn hiếu khí với vi khuẩn ký khí?
6. Thế nào là quan hệ đối kháng? Ứng dụng mối quan hệ đối kháng giữa các nhóm vi sinh vật trong xử lý môi trường?
7. Đất tròng bị ô nhiễm do những nguyên nhân chính nào? Hiện nay ở Việt Nam đang sử dụng các biện pháp nào để hạn chế ô nhiễm đất tròng?
8. Vai trò làm sạch nước thải của vi sinh vật? Các yếu tố ảnh hưởng đến cường độ tự làm sạch nước thải?
9. Các hình thức hô hấp và lén men ở vi khuẩn, ứng dụng trong xử lý môi trường?
10. Có mấy loại vi sinh vật ký khí? Cho ví dụ và nêu vai trò của vi sinh vật ký khí trong thiên nhiên và trong đời sống con người.
11. Vai trò của vi sinh vật hiếu khí trong xử lý phế thải hữu cơ?
12. Vai trò của vi sinh vật cố định nitơ? Các biện pháp sinh học để làm tăng lượng nitơ trong đất?
13. Tại sao trong thiên nhiên vi sinh vật tăng lên không tương ứng với tốc độ sinh sản vô cùng nhanh chóng của nó?
14. Các nhân gây bệnh trong nước thải? Vai trò của vi sinh vật ký khí trong môi trường tự nhiên?
15. VSV tham gia phân giải chất hữu cơ chứa cellulose? Các phương pháp xử lý phế thải hữu cơ bằng công nghệ vi sinh vật?
16. Quy trình xử lý ký khí nước thải sinh hoạt bằng công nghệ vi sinh vật?
17. Nguyên lý chung của quá trình xử lý sinh học hiếu khí? Các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến quá trình xử lý nước thải hiếu khí?
18. Trình bày mối quan hệ tương hỗ giữa vi sinh vật với đất, vi sinh vật với cây trồng? Ứng dụng trong bảo vệ môi trường?
19. Một số biện pháp vi sinh vật bảo vệ môi trường hiện nay?
20. Một số định hướng nghiên cứu hiện nay về vi sinh vật học môi trường của Việt Nam?

II. Gợi ý trả lời các bài tập

Chương Mở đầu

Chọn đáp án đúng nhất:

6. j. Tất cả các nhóm trên; 7. d. Tất cả các ý trên.

Điền vào các chỗ trống:

8. Archaea (cỗ khuẩn), Bacteria (vi khuẩn), Eukarya (cơ thể nhân thực).
9. Vi môi trường.

Chương 1. Vi sinh vật nhân sơ

Chọn đáp án đúng nhất:

7. A. 1-2-3-4;
8. d. Các phospholipid;
9. d. Nó bảo vệ tế bào khỏi lực thẩm thấu.
10. So sánh một số tính chất giữa vi khuẩn (Bacteria) và cỗ khuẩn (Archaea)

Đặc điểm so sánh	Bacteria	Archaea
a. Tế bào có dạng hình vuông hoặc hình sao	–	+
b. Không hình thành nội bào tử	–	+
c. Không có intron trong gene (hệ gene không phân mảnh, gene liên tục)	+	–
d. Nhiều loài sinh methane và dinh dưỡng methane	–	+
e. Sống trong điều kiện sinh thái đặc biệt	–	+
f. Lipid màng có glycerol, acid béo mạch thẳng và liên kết ester	+	–
j. Có thymine trong RNAt	+	–

Điền vào các chỗ trống:

11. a. Chất nhân, màng nhân; b. Ti thể, lưới nội chất, bộ máy Golgi;
c. PG hay peptidoglycan; d. 70S.
12. a. Thể nghỉ; b. môt.

Chương 2. Vi sinh vật nhân thực

Chọn đáp án đúng nhất:

8. c. Cơ thể đa bào;
9. b. Những vi sinh vật nhân thực.
10. Điền vào bảng so sánh một số đặc điểm giữa vi khuẩn, vi nấm và vi tảo:

Đặc điểm so sánh	Vi khuẩn	Vi nấm	Vi tảo
a. Loại ribosome tế bào chất	70S	80S	80S
b. Chất đặc trưng ở thành tế bào	PG (peptidoglycan)	Chitin, hemicellulose	Cellulose
c. Dạng dự trữ glucose	PHB, glycogen, tinh bột (tùy loài)	Glycogen	Tinh bột
d. Quan hệ với oxygen	Kỵ khí đến hiếu khí	Hiếu khí	Hiếu khí

Diễn vào các chỗ trống:

11. a. Nhân thực; b. Chitin hay hợp chất chứa chitin; c. Cellulose;
d. Lục lạp; e. Hoại sinh, ký sinh, cộng sinh; f. Bằng bào tử; J. Lông; i. Roi.

Chương 3. Virus học

Chọn đáp án đúng nhất:

6. c. Có màng bọc bên ngoài vỏ capsid, có lông dính kết hòng cầu.
7. a, b, d.
8. So sánh một số đặc điểm Có (+)/Không (-) của virus với một số loại VSV khác:

Đối tượng so sánh	Nuôi cấy được trên MT nhân tạo	Có ribosome	Phân đôi	Có DNA và RNA	Ký sinh mức độ
Virus	–	–	–	– có một loại	Phân tử
Mycoplasma	+	+	+	+	-/+
Rickettsia	-/+	+	+	+	-/+
Clamydia	-/+	+	+	+	-/+

Diễn vào các chỗ trống:

9. a. Gai; b. Carbohydrate; c. Protein; d. Thụ thể (*receptor*).
10. a. Viroid; b. Khoai tây, cà chua, dừa...
11. Prion
12. a. Vi khuẩn; b. Gây tan (lytic); c. Tế bào tiềm tan (*lysogenic cell*).
13. a. Nhân lên; b. Acid nucleic;
c. Hệ thống enzyme của tế bào; d. Lõi acid nucleic, vỏ là protein.

Chương 4. Sinh lý học vi sinh vật

Chọn đáp án đúng nhất:

8. d. Là những cơ thể quang tự dưỡng carbon.

9. Nghiên cứu chất nhận electron được sử dụng trong quá trình hô hấp, các nhóm VSV tham gia chủ yếu là:

- (1) Tất cả vi khuẩn hiếu khí, nấm, động vật nguyên sinh, vi tảo.
- (2) Vi khuẩn đường ruột; (3) *Pseudomonas*, *Bacillus*.
- (4) *Desulfovibrio*, *Deufotomaculum*.
- (5) Vi sinh vật sinh *methane*.
- (6) *Desulfuromonas*, *Thermoproteus*.
- (7) *Pseudomonas*, *Bacillus*.

10. Nấm men rượu phân giải glucose

a. Khi có oxygen phân tử: Glucose → EMP (aldolase) → oxy hóa pyruvate → chu trình Krebs → chuỗi vận chuyển điện tử → CO₂ + H₂O + nhiều năng lượng. Tế bào nấm men có nhiều năng lượng, sinh trưởng nhanh, nảy chồi nhiều.

b. Khi không có oxy phân tử: Glucose → pyruvate decarboxylase → alcoholdehydrogenase → ethanol + CO₂ + năng lượng ít (2% năng lượng glucose) nấm men ít nảy chồi, sinh trưởng chậm.

Điều vào chỗ trống:

11. a. Đơn vị hình thành khuẩn lạc; b. CFU – Colony-forming unit; c. đơn độc (riêng biệt).
12. a. Máy đo độ đục; b. Hấp phụ (absorption), c. Tỷ lệ thuận.
13. a. Không liên tục; b. Batch; c. Liên tục, d. Lấy khói nồi phản ứng (nồi lên men).

Chương 5. Vi sinh vật môi trường đất

Chọn đáp án đúng nhất:

12. d. Tất cả các yếu tố trên đều được sử dụng để trợ giúp sinh trưởng của các VSV đất.
13. b. Vùng rẽ.
14. c. Cả a và b đều đúng.

Điều vào chỗ trống:

15. Đất vô cơ (*Mineral soil*);
16. Chất mùn (*Humus*)

Chương 6. Vi sinh vật môi trường không khí

Chọn đáp án đúng nhất:

5. d. Cả ba ý trên.
6. a, b, c.
7. d. Tất cả phương pháp trên.

Điều vào chỗ trống:

8. a. Bụi đất bẩn, hơi nước mang VSV; b. Sự hô hấp;
9. a. hoặc các giọt chất lỏng lơ lửng trong không khí; b. Chất khí khác; c. Được hấp thụ.

Chương 7. Vι sinh vật môi trường nước

Chọn đáp án đúng nhất:

6. b. Các hồ phú dưỡng.

7. d. *Thiobacillus thiooxidans*.

Điền vào chỗ trống:

8. BOD.

9. Thực vật phù du (Phytoplankton).

10. Vi khuẩn nano, vi khuẩn siêu nhỏ.

Chương 8. Vι sinh vật môi trường cực trị

Chọn đáp án đúng nhất:

5. c. Nó chuyển động tròn và chuyển động lên xuống bên trong một cái bao chứa các chất dinh dưỡng mà nó cần.

6. j. Cả 5 nhóm trên.

Điền vào chỗ trống:

7. a. Cực đoan; b. Ưa cực đoan.

8. a. H₂; b. Acetate.

9. a. Sự khuếch tán oxygen thấp; b. Thiếu oxygen; c. Thiếu khí.

Chương 9. Vι sinh vật ứng dụng trong xử lý phế thải

Chọn đáp án đúng nhất:

7. d. Sự tiệt trùng (*Sterilization*).

8. a. Các quá trình sinh học.

9. b. Xử lý bùn hoạt tính.

Điền vào chỗ trống:

10. Sự tiệt trùng (*Sterilization*);

11. DNA;

12. Chất kháng sinh. (*Antibiotic*)

Chương 10. Chế phẩm vi sinh vật và cách sử dụng

Chọn đáp án đúng nhất:

7. j. Tất cả các bước trên;

8. Chủng xạ khuẩn sinh kháng tạo chế phẩm dùng trong bảo vệ thực vật được chọn theo những tiêu chuẩn sau:

a. Hoạt lực kháng sinh cao; b. Hoạt phổ kháng sinh rộng; c. Giữ được hoạt tính khi đưa vào đồng ruộng; d. Không độc đối với cây trồng, người, động vật và các VSV khác.
e. Không thuộc loại kháng sinh dùng trong y học.

9. Những điểm cần lưu ý khi sử dụng chế phẩm trừ sâu VSV trong bảo vệ thực vật.

- a. Chế phẩm còn hạn sử dụng và không bị tạp nhiễm.
- b. Đúng đối tượng, đúng thời điểm và liều lượng cần thiết.
- c. Tránh ánh nắng mặt trời chiếu trực tiếp vào chế phẩm.
- d. Tránh sử dụng đồng thời thuốc trừ sâu và thuốc diệt cỏ.

10. Một số điểm cần chú ý khi sử dụng phân vi sinh vật của Việt Nam:

Phân vi sinh vật sản xuất ở nước ta thường có dạng bột màu nâu, đen, vì phần lớn các nơi sản xuất đã dùng than bùn làm chất độn, chất mang vi khuẩn.

Phân vi sinh vật sản xuất trong nước thường được sử dụng bằng cách trộn với các hạt giống đã được vẩy nước để ẩm hạt trước khi gieo 10 – 20 phút. Nồng độ sử dụng là 100 kg hạt giống trộn với 1 kg phân vi sinh vật.

Các chế phẩm vi sinh vật sản xuất trong nước thường không cát giữ được lâu. Thường sau từ 1 đến 6 tháng, hoạt tính của các vi sinh vật trong chế phẩm giảm mạnh. Vì vậy, khi sử dụng cần xem kỹ ngày sản xuất và thời gian sử dụng được ghi trên bao bì.

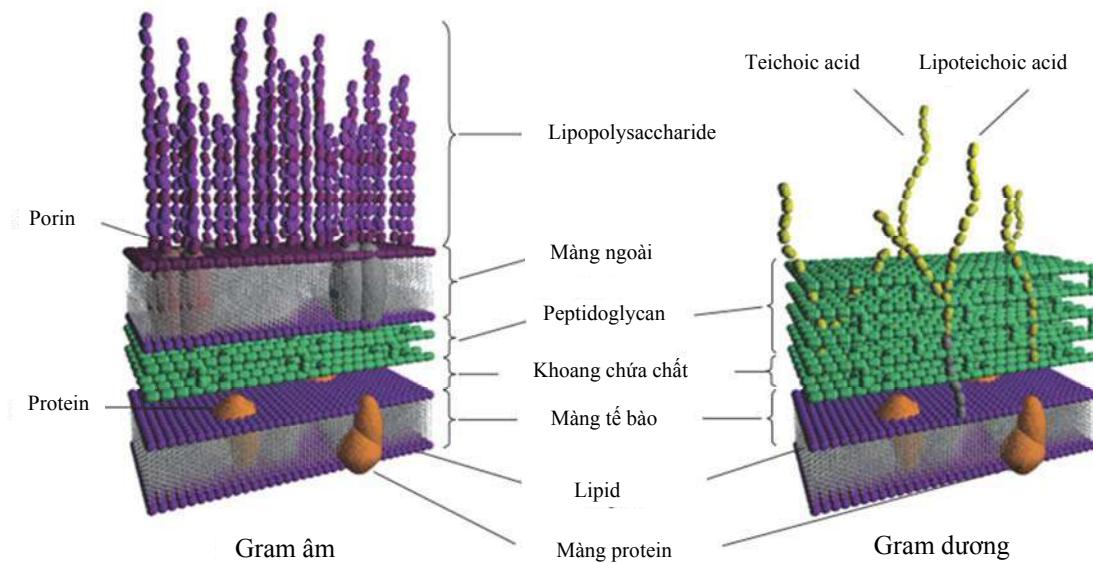
Chế phẩm vi sinh vật là một vật liệu sống, vì vậy nếu cát giữ trong điều kiện nhiệt độ cao hơn 30 °C hoặc ở nơi có ánh nắng trực tiếp chiếu vào, thì một số vi sinh vật bị chết. Do đó hiệu quả của chế phẩm bị giảm sút. Cần cát giữ phân vi sinh vật ở nơi mát và không bị ánh nắng chiếu vào.

Phân vi sinh vật thường chỉ phát huy tác dụng trong những điều kiện đất đai và khí hậu thích hợp. Chúng thường phát huy tốt ở các vùng đất cao và đối với các loại cây trồng cạn.

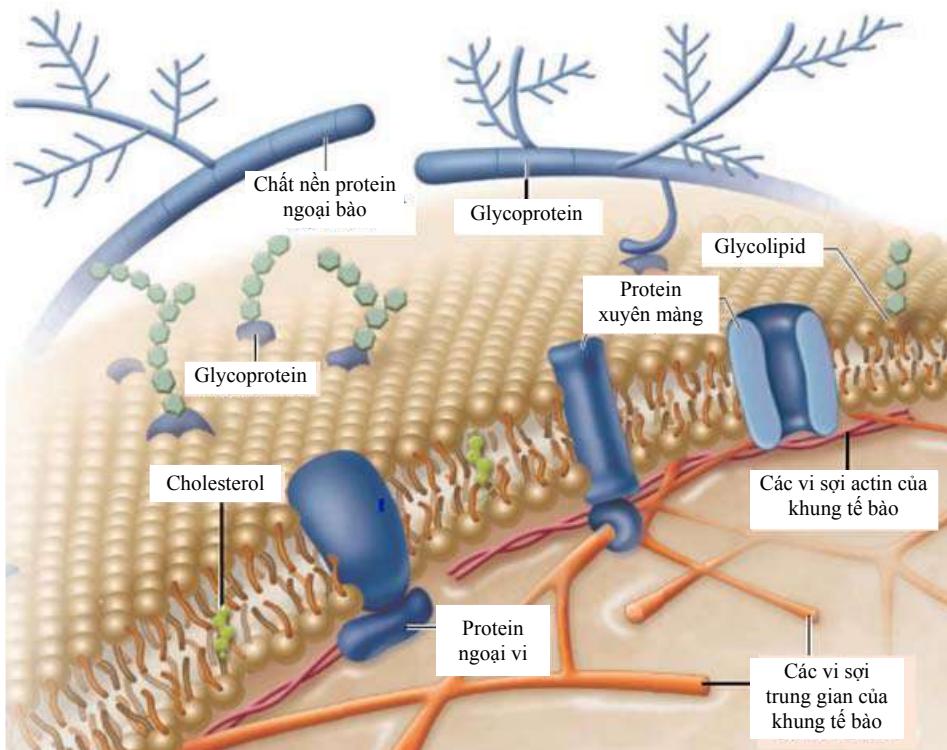
Điều vào chỗ trống:

- 11. a. Bột; b. Nước; 12. a. Hòa vào nước; b. Tươi vào gốc cây.

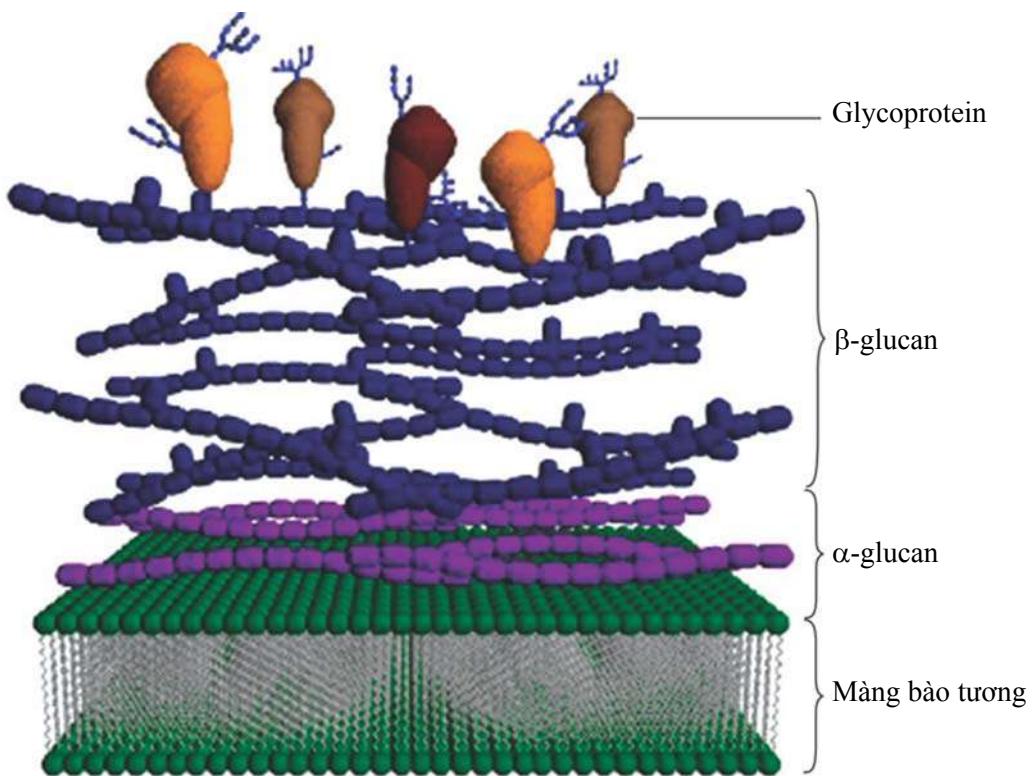
PHỤ LỤC



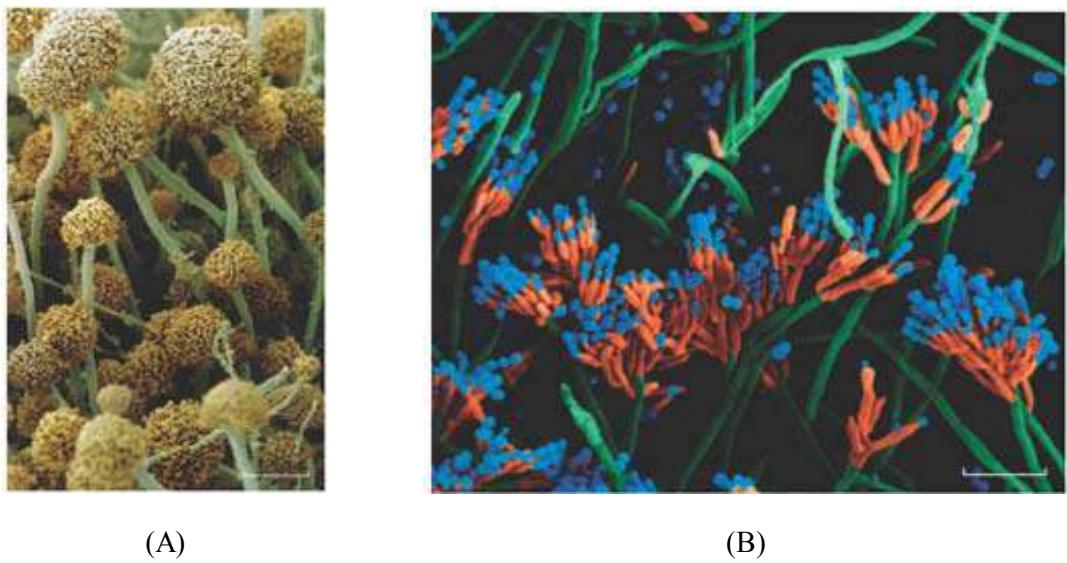
Hình 1.4. Sơ đồ minh họa cấu trúc thành tế bào vi khuẩn Gram âm và Gram dương.
(Pepper et al. 2015, vẽ bởi Wayne L. Miller, McGill University).



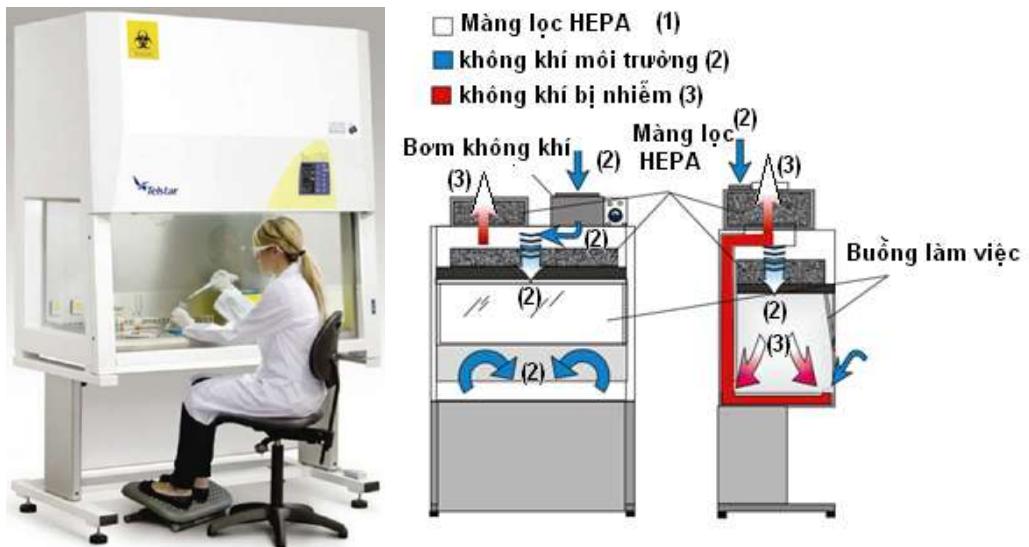
Hình 1.5. Mô hình cấu trúc màng sinh chất (Peter Raven et al., 2017).



Hình 2.2. Cấu trúc thành tế bào nấm (Pepper et al., 2015).



Hình 2.5. Hình ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử quét màu sợi nấm mang bào tử.
(A), nấm mốc *Rhizopus*; (B), *Penicillium roquefortii* (Jeffrey et al., 2011).



Hình 6.4. Tủ cấy vô trùng (trái) và dòng không khí trong tủ cấy vô trùng mặt cắt trước và bên (phải).
 Dòng không khí chưa được lọc (màu xanh) khi được bơm không khí bơm vào và qua màng lọc HEPA thành không khí sạch trước khi được thổi vào trong buồng làm việc tránh cho mẫu vật bị nhiễm bởi không khí bên ngoài. Không khí sạch ở trong buồng làm việc bị nhiễm (màu đỏ) từ mẫu vật sẽ được thổi qua màng lọc trước khi thải ra ngoài môi trường.



Chaetoceros debilis (tảo cát)

Oocystis sp.

Volvox sp.



Ceratium sp.

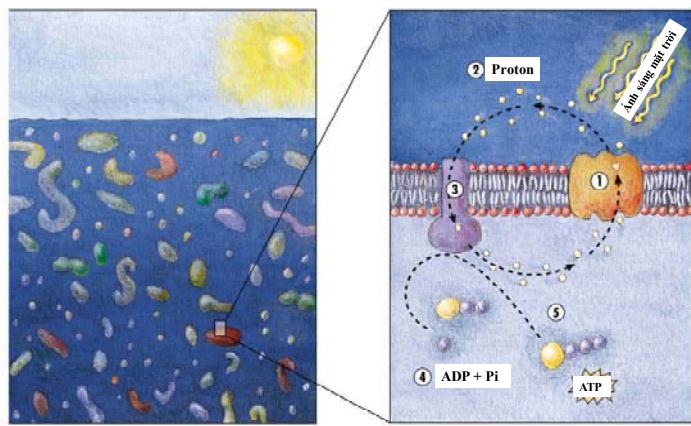


Calanoida sp.



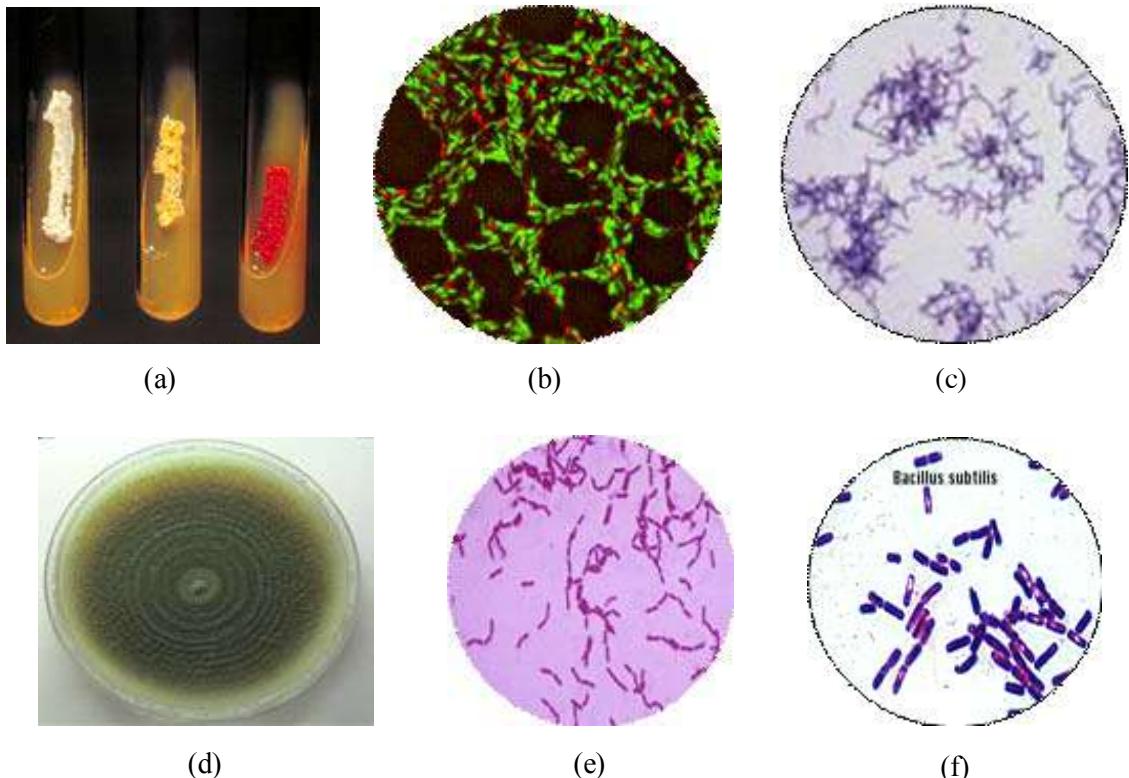
Hyperia macrocephala

Hình 7.3. Sinh vật phù du.



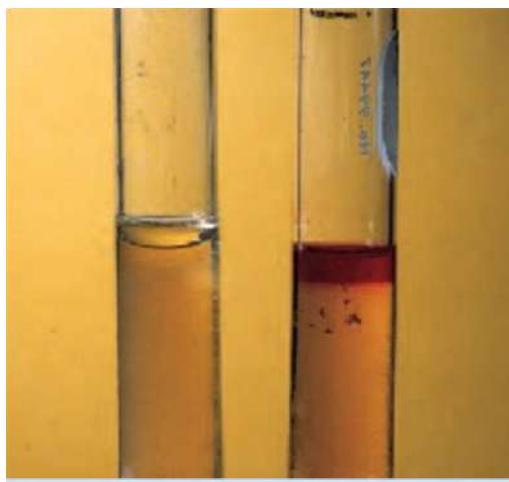
Hình 7.5. Cấu trúc protein rhodopsin ở màng tế bào (Delong et al., 2010).

Vi khuẩn phù du (trái) và cấu trúc protein rhodopsin (phải). (1) Protein rhodopsin sử dụng ánh sáng mặt trời để chuyển proton xuyên qua màng tế bào; (2) Proton ngoài tế bào; (3) Enzyme ATPase chuyển proton sử dụng lực vận chuyển proton để tổng hợp ATP (5) từ ADP + Pi (4).

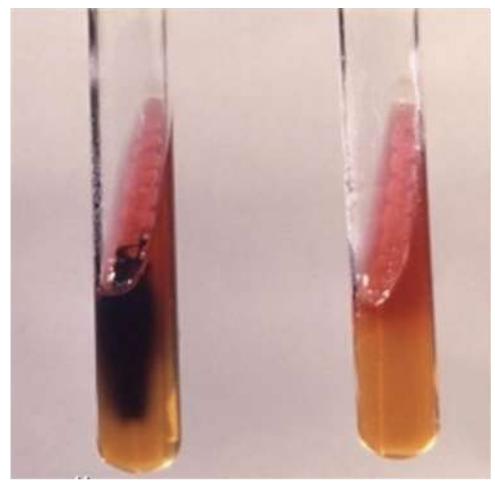


Hình 9.13. Một số chủng VSV sử dụng trong xử lý phế thải.

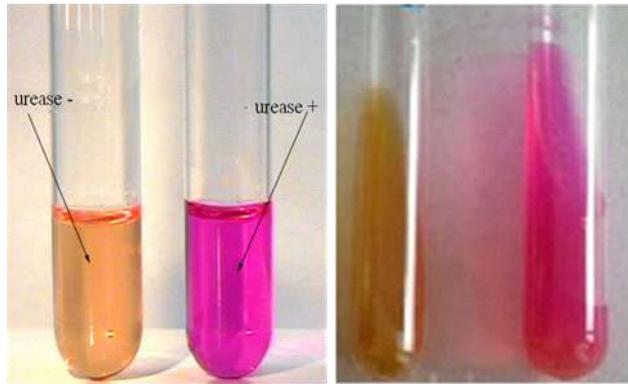
a – Các khuỷn lục xạ khuỷn màu trắng – *Actinomadura madurae*, màu vàng – *Nocardia*, màu đỏ – *Micromonospora spp.*; b – *Cellulomonas*; c – *Actinomycetes*; d – *Metarhizium anisopliae*; e – *Lactobacillus acidophylus*; f – *Bacillus subtilis*.



Hình 25. Khả năng sinh indole.



Hình 26. Khả năng sinh H_2S .



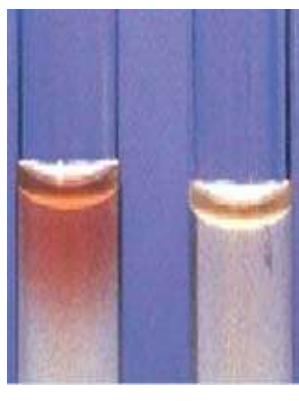
a) Môi trường lỏng: urease- (trái urease+ (phải)
b) Môi trường đặc: urease- (trái urease+ (phải)

Hình 27. Khả năng phân giải urea.

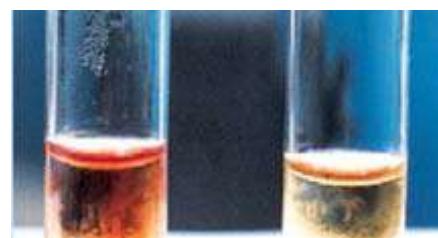


a) glucose-, lactose-, b) glucose+, sinh hơi+,
c) H_2S+ , sinh hơi-; d) glucose-, lactose+, H_2S+

Hình 28. Khả năng lên men carbohydrate.



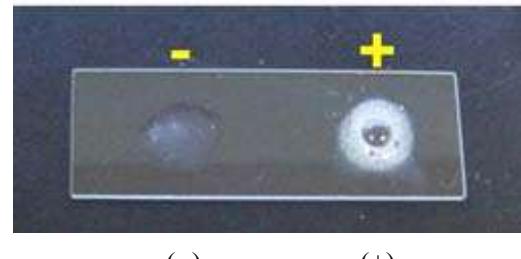
Hình 29. Phản ứng đở methyl (RM).



Hình 30. Phản ứng V.P.



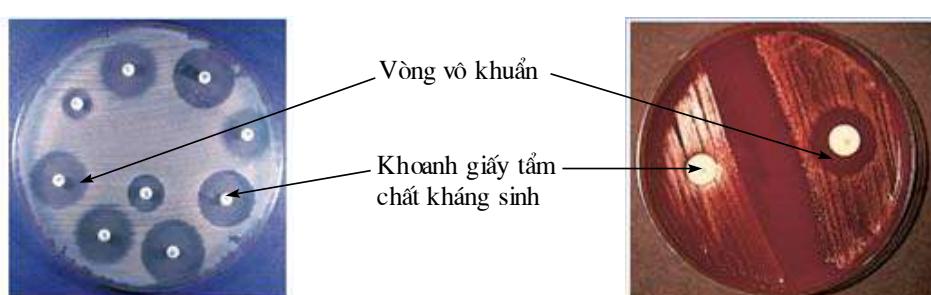
Hình 31. Kích thước của các khay thí nghiệm.



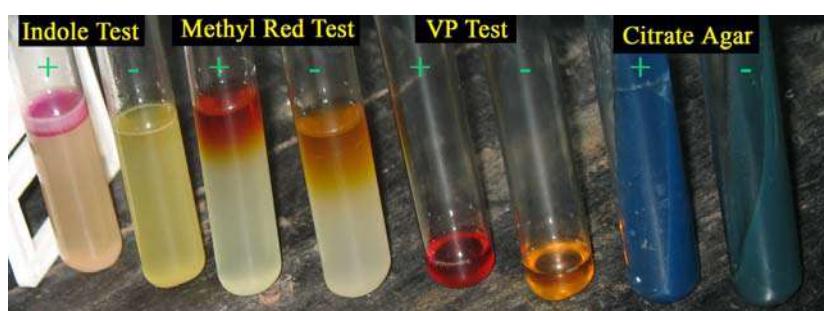
Hình 32. Phát hiện enzyme catalase của vi sinh vật nghiên cứu.



Hình 51. Hoạt tính enzyme của vi sinh vật.



Hình 52. Vòng vỡ khuẩn tạo thành quanh các khoanh giấy tẩm chất kháng sinh.
(Prescot L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002).



Hình 53. Thử nghiệm IMVIC: Dùng để phân biệt E.coli với các vi khuẩn đường ruột khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Kiều Hữu Ánh, 1999. *Giáo trình Vi sinh vật học công nghiệp*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Kiều Hữu Ánh, 2006. *Giáo trình Vi sinh vật học – Lý thuyết và bài tập giải sẵn*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Lê Huy Bá, 2000. *Môi trường*. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
4. Nguyễn Lan Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty, 2003. *Vi sinh vật học*. NXB Giáo dục.
5. Nguyễn Lan Dũng dịch, 1983. *Thực tập Vi sinh vật*, Egorov N.X., NXB Mir, Maxcova, NXB Đại học và Trung học chuyên nghiệp Hà Nội.
6. Nguyễn Thành Đạt, 2008. *Câu hỏi và bài tập vi sinh học*. NXB Đại học Sư phạm Hà Nội.
7. Tăng Văn Đoàn, 2001. *Kỹ thuật môi trường*. NXB Giáo dục.
8. Vũ Thị Minh Đức, 2001. *Thực tập vi sinh vật học*. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
9. Hoàng Huệ, 1996. *Xử lý nước thải*. NXB Xây dựng.
10. Trịnh Xuân Lai, 2000. *Tính toán thiết kế các công trình xử lý nước thải*. NXB Xây dựng.
11. Biên Văn Minh (chủ biên), Kiều Hữu Ánh, Phạm Ngọc Lan, Đỗ Thị Bích Thủy, Ngô Thị Tường Châu, 2013. *Vi sinh vật học công nghiệp*. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
12. Lê Quốc Tuấn, 2009. *Vi sinh môi trường*. Trường Đại học Nông lâm, Tp. Hồ Chí Minh.
13. Trần Linh Thưóc, *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*. NXB Giáo dục.
14. Mai Đình Yên, 1990. *Cơ sở sinh thái học*, Đại học Tổng hợp Hà Nội.

Tiếng Anh

15. Bertrand J. C., Caumette P., Lebaron P., Matheron R., Normand P., Sime-Ngando T., 2011. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer.
16. Bitton G., 2005. *Wastewater Microbiology*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc.
17. Bowen H. J. M, 1966, *Trace metals in biochemistry*. Academic Press, New York.
18. Cowan M. K. Bunn J., Atlas R. M., Smith H., 2016. *Microbiology fundamentals: a clinical approach*, 2nd ed., McGraw-Hill.
19. Hurst C.J., Crawfod R. L., 2002. *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press.

20. Madsen E. L., 2008. *Environmental Microbiology: From genomes to biogeochemistry*, 1st ed., Blackwell Publishing Ltd., USA.
21. Mitchell R., Ji-Dong Gu, 2009. *Environmental microbiology*, 2nd ed., Wiley-Blackwell.
22. Okafor N., 2011. *Environmental Microbiology of Aquatic and Waste Systems*, Springer.
23. Pepper I. L. Gerba C. P., 2004. *Environmental Microbiology A Laboratory Manual* (http://site.iugaza.edu.ps/tbashiti/files/2010/02/Environmental_Microbiology.pdf)
24. Pepper I. L., Gerba C. P., Gentry T. J., 2015. *Environmental Microbiology*, 3rd edition. Academic Press, USA.
25. Pommerville J. C., 2010. *Alcamo's fundamental Microbiology*, 9th ed., Jones & Bartlett Publishers.
26. Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002. *Microbiology*, McGraw-Hill.
27. Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., 2002. *Microbiology – Laboratory*, McGraw-Hill.
28. Raven P. Johnson G., Mason K., Losos J., Singer S., 2017. *Biology*, 11th edition. McGraw-Hill.
29. Tchobanoglous G., Burton F. L., 1991. *Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse*, McGraw-Hill.

GIÁO TRÌNH VI SINH VẬT HỌC MÔI TRƯỜNG

NHÀ XUẤT BẢN BÁCH KHOA – HÀ NỘI
Ngõ 17 Tạ Quang Bửu – Hai Bà Trưng – Hà Nội
ĐT: 024. 38684569; Fax: 024. 38684570
<http://nxbbk.hust.edu.vn>

Chịu trách nhiệm xuất bản:
Giám đốc – Tổng biên tập: TS. BÙI ĐỨC HÙNG

Phản biện: GS. TS. PHẠM VĂN TY
TS. PHẠM QUANG CHINH

Biên tập: ĐỖ THANH THÙY

Sửa bản in: TRẦN THỊ PHƯƠNG

Trình bày bìa: DƯƠNG HOÀNG ANH

In 250 cuốn khổ (19 × 27) cm tại Công ty TNHH đầu tư thương mại và dịch vụ Nam Hué,
số 109 Trần Đại Nghĩa, Hai Bà Trưng, Hà Nội.

Số đăng ký KHXB: 518 – 2018/CXBIPH/01 – 12/BKHN; ISBN: 978-604-95-0430-3.

Số QĐXB: 32/QĐ – ĐHBK – BKHN ngày 28/3/2018.

In xong và nộp lưu chiểu quý II năm 2018.